THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Janine DOLY

Licenciée ès-Sciences
Attachée de Recherches
au Centre National de la Recherche Scientifique

1ÈRE THÈSE :

UN NOUVEAU POLYNUCLEOTIDE:
Le polyadénosine diphosphate ribose (polyADPR)

2ème THÈSE:

LE CODE GENETIQUE

Soutenues le 19 Septembre 1968 devant la Commission d'Examen:

MM. J. P. EBEL, Professeur, Président
J. E. COURTOIS, Professeur,
J. H. WEIL, Professeur,
P. CHAMBON, Professeur
} Examinateurs

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Janine DOLY

Licenciée ès-Sciences
Attachée de Recherches
au Centre National de la Recherche Scientifique

1ÈRE THÈSE :

UN NOUVEAU POLYNUCLEOTIDE:
Le polyadénosine diphosphate ribose (polyADPR)

2ème THÈSE:

LE CODE GENETIQUE

Soutenues le 19 Septembre 1968 devant la Commission d'Examen:

MM. J. P. EBEL, Professeur, Président
J. E. COURTOIS, Professeur,
J. H. WEIL, Professeur,
P. CHAMBON, Professeur
} Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552704_0026

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELL G. MILLOT.

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, Mlle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maîtres de Conférences Honoraire : R. WEIL

Professeurs :

H.J.MARESQUELLE...	T.	Biologie végétale
A.ROUSSEL.....	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H.FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J.ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P.LACROUTE.....	T.	Astronomie
J.H.VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A.MAILLARD.....	T.	Physicochimie du Pétrole
S.GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L.SACKMANN.....	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE.....	T.	Chimie Physique
R.LOMBARD.....	T.	Chimie organiqee
Melle M.PEREY.....	T.	Chimie nucléaire
S.GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P.JOLY.....	T.	Biologie générale
H.BENOIT.....	T.	Physicochimie macromoléculaire
P.CUER.....	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G.MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R.LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H.SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R.ROHMER.....	T.	Chimie minérale

Melle A.GAGNIEU... T.T.P.Botanique
S.NIKITINE..... T. Physique générale
F.STUTINSKY..... T. Physiologie générale
B.WURTZ..... T.T.P.Chimie biologique
J.BRENET..... T. Electrochimie
G.OURISSON..... T.T.P.Chimie
A.COCHE..... T.T.P.Physique nucléaire
R.CERF..... T. Physique générale
J.FRENKEL..... T.T.P.Mathématiques
P.TAGLANG..... T. Physique
J.P.LONCHAMP..... T.T.P.Physique
A.DELUZARCHE.....T.T.P.Chimie
J.B.DONNET..... T.T.P.Chimie Physique
R.ARMBRUSTER..... T.T.P.Physique
A.ROCHE..... T.T.P.Physique du Globe
L.HIRTH..... T. Microbiologie
A.SIGOT..... P.S.C.Zoologie
J.COGNE..... T.T.P.Géologie
A.FUCHS..... T. Mécanique rationnelle
A.GALLMANN..... T.T.P.Physique
P.MIALHE..... T.T.P.Physiologie animale
J.P.EBEL..... T. Chimie biologique
J.PARROD..... T.T.P.Chimie
R.WEY..... T.T.P.Chimie
Mme D.MAGNAC..... T.T.P.Physique
M.DAUNE..... P.S.C.Physique
J.P.ADLOFF..... T.T.P.Chimie nucléaire
D.BERNARD..... T.T.P.Méthodes mathématiques de la physiqu
M.ZISMAN..... T.T.P.Mathématiques
E.DANIEL..... T. Physique expérimentale
P.CHEVALLIER..... T. Physique
J.GREMILLARD..... T.T.P.Mécanique des Fluides
P.CARTIER..... T. Mathématiques
G.REEB..... T. Topologie
F.NORGUET..... T. Analyse supérieure
R.CHAUVIN..... T. Psychophysiologie

J.WUCHER..... P.S.C.Physique
Mme M.BRINI..... P.S.C.Chimie
G.PERNY..... P.S.C.Physique
R.BARO..... P.S.C.Physique
H.DURANTON..... P.S.C.Botanique
R.WEISS..... T.T.P.Chimie
P.FEDERLIN..... T.T.P.Chimie
J.LERAY..... P.S.C.Physique
J.P.SCHWING..... P.S.C.Chimie
M.SIESKIND..... P.S.C.Physique
G.MONSONEGO..... T. Physique théorique
P.GABRIEL..... T.T.P.Mathématiques
C.WIPPLER..... T. Physicochimie des Hauts Polymères industriels
P.A.MEYER..... T.T.P.Mathématiques
G.WEILL..... P.S.C.Physique
J.M.BLOCH..... T. Chimie
A.CLAUSS..... P.S.C.Chimie
E.FOLLENIUS..... P.S.C.Zoologie
J.LUCAS..... P.S.C.Géologie
G.GLAESER..... T. Mathématiques
J.J.THIEBOLD..... P.S.C.Biologie animale
J.H.WEIL..... P.S.C.Chimie biologique
D.FOATA..... P.S.C.Mathématiques

Professeurs Associés :

S.R.DE GROOT..... Physique
R.MARCHESSAULT.... Physicochimie macromoléculaire
G.LUMER..... Mathématiques
R.MORIARTY..... Chimie organique
J.AUSLANDER..... Physique corpusculaire

Maîtres de Conférences :

H.DANAN..... Physique
Mme WINTER Ch..... Physique
J.P.EBERHART..... Minéralogie
Mme D. CAGNIANT... Chimie
X.FERNIQUE..... Mathématiques

J.STREITH..... Chimie
F. GAUTIER..... Physique propédeutique
G.SUTTER..... Physique électronique
J.L.VERDIER..... Mathématiques
J.M.LEHN..... Chimie
Cl. ROBERT..... Physique
M.LACROUTE..... Biologie végétale
M.GOUNOT..... Botanique
J.PRADINES..... Mathématiques
A.GIRARDIE..... Biologie animale
F.BECKER..... Physique.mathématique
J.DEHAND..... Chimie minérale
Cl.GODBILLON..... Mathématiques
M.KAROUBI..... Mathématiques
A.MIGNOT..... Mathématiques appliquées

Maîtres de conférences Associé :

V.AVANISSIAN..... Mathématiques

Secrétaire : G.SAINT-PE

A MES PARENTS

qui m'ont toujours encouragée dans mon travail. En témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A MES FRERE ET SOEURS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MANDEL,

qui a bien voulu nous accueillir comm
élève dans son laboratoire, nous prodigue
son appui matériel et moral, sa confiance
et ses conseils éclairés. En témoignage d
notre profonde reconnaissance et de notre
respectueux attachement.

A V A N T P R O P O S

Le présent travail a été effectué à l'INSTITUT DE CHIMIE BIOLOGIQUE de la Faculté de Médecine de Strasbourg, sous la direction du Professeur P. Chambon, que nous remercions pour nous avoir communiqué son enthousiasme, son esprit critique, son acharnement au travail, pour nous avoir initié à la recherche avec le Professeur J.D. Weill dont nous avons apprécié la compétence et la bienveillance et dont nous gardons le meilleur souvenir.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur J.P. Ebel notre parrain au C.N.R.S. qui, après avoir suivi pendant plusieurs années notre travail, a accepté la présidence de ce jury. Notre profonde gratitude s'adresse à Monsieur J.E. Courtois, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a accepté d'examiner et de juger ce travail après nous avoir conseillée et généreusement accueillie dans son laboratoire. Nous remercions également Monsieur le Professeur J.H. Weil, qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Nous tenons à assurer de notre profonde reconnaissance Monsieur F. Petek, Docteur en Pharmacie à Paris pour son accueil bienveillant, ses encouragements constants, son aide et ses précieux conseils.

Nous sommes heureuse de remercier très cordialement Madame Stroser, Licenciée ès-Sciences, avec laquelle nous avons collaboré au début de ce travail.

Les concours successifs et toujours efficaces de nos collaborateurs techniques : Madame Anne Lauer, Madame Charlotte Hauss et Monsieur Guy Dretzen, ont grandement facilité notre tâche.

Nous remercions Monsieur R. Bieth pour ses conseils et son aide dans les dosages de microkjeldahl, Mesdemoiselles M. Wintzerith et M.E. Ittel pour la préparation de nucléoles, Monsieur M. Ledig pour la détermination des compositions en acides aminés qu'il a eu l'obligeance d'effectuer, ainsi que tous nos camarades du laboratoire qui, de près ou de loin, nous ont aidé dans ce travail.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Mesdemoiselles V. Troeger et H. Lerner pour les travaux de [illegible].

Que Messieurs A. Landmann, E. Taubert, W. Reymann et R. Fritsch soient très sincèrement remerciés pour leur contribution à la réalisation de nombreux problèmes techniques.

Nous remercions le Centre National de la Recherche Scientifique et la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique qui ont rendu possible ce travail de recherches.

I N T R O D U C T I O N

En 1963, REVEL, étudiant dans notre laboratoire les relations existant entre la synthèse des RNA et celle du DPN, montra que l'addition de NMN à des noyaux des cellules rénales incubés *in vitro*, stimulait l'incorporation de [C^{14}]adénine dans un matériel acido-insoluble.

Cette observation incita le groupe de CHAMBON, WEILL et BUSCH, qui s'intéressaient à la RNA polymérase animale, à ajouter du NMN à un milieu d'incubation destiné à mesurer l'activité de la RNA polymérase nucléaire agrégée (RNA polymérase liée à la chromatine). Utilisant comme marqueurs de l'ATP radioactif, ils observèrent une stimulation très importante de l'incorporation de la radioactivité dans un matériel acido-insoluble. Cette stimulation persistait même en l'absence des trois autres nucléosides triphosphates. Des études préliminaires avaient suggéré que le NMN pouvait stimuler la formation de polyadénylate.(2)

En 1964, à mon arrivée dans ce groupe de chercheurs, nous avons décidé d'étudier de plus près la nature du polymère formé et les conditions de sa biosynthèse. Ces études nous ont conduit à isoler un nouveau polymère nucléotidique, le polyadénosine diphosphate ribose (polyADPR), à en démontrer la structure et à étudier les modalités de sa biosynthèse *in vivo* et *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

1 - MATERIEL.

1.1 - Animaux.

Les premières expériences ont porté sur des rats blancs de souche Wistar, d'environ 300 g. Nous avons par la suite utilisé des poulets de race Cops, de 5 semaines (élevage de Mr. Koerckel à St. Léonard - Bas-Rhin).

1.2 - Nucléotides radioactifs.

1.2.1 - [P^{32}-P^{32}] DPN

1.2.1.1 - Synthèse biologique.

KAPLAN et coll.[4] avaient provoqué une augmentation de 10 fois du taux de pyridine nucléotides hépatiques en injectant de la nicotinamide à des souris. Cette augmentation était maximale 8 à 12 heures après l'administration de la nicotinamide par voie veineuse ou intrapéritonéale et le pyridine nucléotide synthétisé était essentiellement du DPN.

Nous appuyant sur ces observations, nous avons injecté la nicotinamide (Hoffman-Laroche), en solution dans du sérum physiologique, à la dose de 50 mg/100 g de rat par voie intrapéritonéale (0,2 ml environ). La synthèse du DPN dans le foie de rat est maximale 9 heures après l'injection de nicotinamide.

Le radiophosphate (C.E.A.) sans entraîneur a été injecté par voie intrapéritonéale 5 heures après la nicotinamide à la dose de 750 µCi pour 100 g de rat dans un volume de 0,2 ml de sérum physiologique.

Les animaux ainsi traités ont été sacrifiés 10 h après l'administration de nicotinamide. Les foies aussitôt prélevés dans le l'acide perchlorique 0,6 N, sont homogénéisés avec

l'aide d'un Ultraturrax (Janke-Kunkel à Stauge, Breisgau, Allemagne). Après une centrifugation de 15 min. à 4.000 g dans une centrifugeuse Jouan G 60, la fraction acidosoluble est neutralisée (en présence de rouge de méthyle) par KOH 6 N, centrifugée comme précédemment, puis lyophilisée.

Le $[P^{32}-P^{32}]$DPN a été purifié par chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 2 sous forme formiate[5] (1,2 cm x 24). Après adsorption, l'élution a été réalisée grâce à un gradient exponentiel d'acide formique obtenu avec une chambre de mélange de 540 ml contenant initialement de l'eau distillée. Avec de l'acide formique 0,5 N dans le ballon réservoir, nous avons élué successivement le 5'CMP, le DPN, puis le 5'AMP.

Les fractions contenant le DPN furent réunies et lyophilisées. L'identification du DPN dans le résidu lyophilisé fut assurée :

1) par l'obtention de spectres d'absorption caractéristiques en lumière U.V.[6], avant ou après addition de KCN et après réduction du DPN par l'alcool deshydrogénase en présence d'éthanol[7].

2) par la détermination des R_f en chromatographie sur papier dans les solvants 1 et 2 (voir plus loin) en présence d'échantillon de DPN authentique.

L'activité spécifique du $[P^{32}-P^{32}]$DPN ainsi obtenu est environ de 1 µCi/µmole (2.000 cpm/mµmole), les deux phosphates étant également marqués.

1.2.1.2 - Synthèse de [P^{32}]DPN à partir de [α-P^{32}]ATP et de NMN en présence de NMN adénylyltransférase.

La NMN adénylyltransférase[8] catalysant la synthèse de DPN à partir d'ATP et de NMN a été obtenue partiellement purifiée comme sous-produit lors de la purification de la polyADPR synthétase (voir page). Nous l'avons utilisée pour synthétiser in vitro, à partir de NMN et de [α-P^{32}]ATP, du [P^{32}]DPN marqué exclusivement sur le phosphate de l'AMP.

20 µmoles de [α-P^{32}]ATP (d'activité spécifique 50 - 100 µCi/µmole) et 20 µmoles de NMN non radioactif sont incubés en tampon glycocolle-NaOH, pH 8,6 0,05 M, $MgCl_2$ 0,075 M, avec 60 mg de protéines enzymatiques (éluat phosphate de potassium 0,04 M, KCl 2 M des colonnes d'hydroxylapatite (voir page) pendant 50 min. à 37°C.

La réaction est arrêtée par addition de $HClO_4$ 0,5 M final et, après centrifugation, le surnageant neutralisé est adsorbé sur une colonne de Dowex 1 X 2 (1,2 x 25 cm) sous forme formiate. Le DPN est élué par HCOOH 0,05 N et lyophilisé. Son activité spécifique est celle de l'[α-P^{32}]ATP de départ.

1.2.2 - Préparation de [Nam-carboxyl-C^{14}]DPN.

Le Nam-carboxyl-C^{14} DPN a été synthétisé par échange de la nicotinamide de DPN non radioactif avec de la [carboxyl-C^{14}]Nam en présence de DPNase de rate de boeuf (voir p.8).

Nous avons incubé à pH 7,4, 46 µmoles de DPN non radioactif, 320 µmoles de [carboxyl-C^{14}]nicotinamide d'activité spécifique

(environ 0,2 µCi/µmole, 300 cpm/µmole), 3 ml d'enzyme soit 225 unités de DPNase de rate de boeuf et 2 ml d'eau.

Après incubation pendant 15 min. à 37°, la réaction est stoppée par addition d'acide perchlorique (0,3 N final). Après neutralisation, le DPN est purifié sur colonne de Dowex 1 X 2 formiate (1 x 10 cm).

Dans ces conditions on obtient 21 µmoles de [Nam-carboxyl-C^{14}]DPN présentant une activité spécifique d'environ 0,15 µCi/µmole (175 cpm/mµmoles). L'authenticité du DPN fut vérifiée par spectrophotométrie dans l'U.V. et radiochromatographie sur papier (voir page 10).

1.2.3 - Préparation de [ribose-C^{14}] DPN.

On injecte par animal 25 µCi de D-ribose-C^{14}, d'activité spécifique 2,45 mCi/µmole à 10 souris dont la synthèse du DPN est stimulée par injection concomitante de 60 mg de nicotinamide par 100 g de poids corporel. Après un délai de 8 h, les souris sont décapitées, le foie, les reins et la rate sont plongés dans un mélange carboglace-acétone. Après homogénéisation dans 6 volumes de $HClO_4$ 0,6 N et centrifugation, le culot est homogénéisé à nouveau dans $HClO_4$ 0,6 N. Après centrifugation, les deux surnageants sont réunis, neutralisés et lyophilisés. Le DPN est ensuite purifié sur colonne de Dowex 1 X 2. On obtient dans ces conditions 42 µmoles de DPN avec une activité spécifique d'environ 0,12 µCi/µmole (150 cpm/mµmole), le ribose lié au 5'AMP étant environ deux fois plus actif que celui lié au NMN.

1.2.4 - Préparation de NMN marqué à partir de DPN marqué.

Le DPN marqué est hydrolysé en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,6, $MgCl_2$ 0,03 M pendant 60 min. à 37°, par une pyrophosphatase contenue dans une préparation commerciale (Worthington) de phosphodiestérase de venin de serpent.

Après arrêt de la réaction par chauffage 2 min. à 100°C, centrifugation et lavage du culot, le surnageant est passé sur une colonne de Dowex 1 X 2 (5 x 1 cm) sous forme formiate. Dans ces conditions, le NMN n'est pas retenu sur la colonne et est présent dans l'effluent de la colonne après lavage avec de l'eau. Après lyophilisation, le NMN marqué est identifié par son spectre caractéristique et par radiochromatographie dans les solvants 1 et 2 en présence d'échantillon authentique de NMN.

Nous avons ainsi obtenu du [P^{32}]NMN, du [Nam-carboxyl-1-C^{14}] NMN et du [ribose-C^{14}] NMN à partir de [P^{32}-P^{32}]DPN, [Nam-carboxyl-1-C^{14}]DPN et [ribose-C^{14}]DPN.

1.2.5 - Synthèse d'[α-P^{32}]ATP et des autres [α-P^{32}] nucléosides triphosphates.

Le 5'[P^{32}]AMP est synthétisé selon TENER,[10] par estérification du 2'-3'-isopropylidène-adénosine par le cyanoéthanol-phosphate marqué par le P^{32} et préparé à partir de $^{32}PO_4H_3$.

Le 5'[P^{32}]AMP, après purification par chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8 (formiate), a été transformé en [α-P^{32}]ATP selon la méthode de CANNELAKIS et coll. en utilisant

une préparation enzymatique partiellement purifiée de E.coli.

Les [α-P^{32}]GTP, [α-P^{32}]UTP et [α-P^{32}]CTP ont été synthétisés de façon analogue.

1.2.6 - Préparation de [P^{32}-P^{32}]ADPR à partir de [P^{32}-P^{32}]DPN et de DPNase de rate de boeuf.

25 µmoles de [P^{32}-P^{32}]DPN dans 11 ml d'eau distillée sont hydrolysées à pH 7,0 par 450 unités de DPNase de rate de boeuf (voir p. 8), pendant 45 min. à 37°C.

La réaction est arrêtée par addition de 1 ml d'$HClO_4$ concentré et, après centrifugation, le surnageant neutralisé par KOH 6 N, est adsorbé sur une colonne de Dowex 1 X 2 formiate (1 x 12 cm) ; le nicotinamide se trouve dans l'effluent et le [P^{32}-P^{32}]ADPR élué par HCOOH 3 N est identifié par son spectre en lumière U.V. et par radiochromatographie sur papier. Dans ces conditions nous obtenons 15 µmoles d'ADPR (pour le profil d'élution, voir Fig. 9).

1.2.7 - Autres sources de nucléotides radioactifs.

Le [8-C^{14}-adénine] ATP a été acheté aux laboratoires Schwartz,(Orangeburg, New York, N.Y. 10962, USA).

1.3 - Enzymes.

1.3.1 - Préparation de DPNase de rate de boeuf.

Elle a été préparée selon KAPLAN et coll. .200 g de rate de boeuf (obtenue 30 min. après la mort de l'animal) sont homogénéisés à l'Ultraturrax dans 500 ml d'eau distillée froide. On complète à 750 ml et on ajoute 15 ml d'HCO_3Na 0,02 M. Après centrifugation pendant 10 min. à 15.000 g on décante et le

surnageant est recentrifugé 15 min. à 27.000 g. Le culot est alors repris dans 420 ml de HCO_3Na 0,02 M et homogénéisé au Turrax. On centrifuge 15 min. à 15.000 g et les surnageants réunis sont recentrifugés à 27.000 g pendant 15 min. Le culot clair est homogénéisé dans de l'eau distillée, on centrifuge 1 min. à 27.000 g , le surnageant est décanté et conservé à -15°.

L'activité de la préparation ainsi obtenue, testée en milieu aqueux à pH 7,4 est de 35 unités par mg de protéines, une unité correspondant à l'hydrolyse de 1 µmole de DPN/heure.

1.3.2 - Autres sources d'enzymes.

- Pyrophosphatase -phosphodiestérase de venin de serpent (Crotalus adamanteus) : Worthington (V.P.H.) .

- Phosphatase alcaline (d'intestin de poulets) : Worthington (P.C.).

- Désoxyribonucléases :

  - DNase I de pancréas de boeuf non cristallisée : Sigma (DN-C).

  - DNase de pancréas de boeuf : Worthington (D).

- Ribonucléases :

  - RNase de pancréas de boeuf 5 x cristallisée : Sigma type 1A.

  - RNase T1, d'Aspergillus orizae : Worthington (RT1).

  - RNase T2 purifiée : don du Professeur EGAMI.

- Trypsine de pancréas de boeuf, lyophilisée 1 x cristallisée : Worthington (C.D.I.).

- Pronase B (Streptomyces griseus protéase B) : Calbiochem (53 702).

- Pepsine (de muqueuse gastrique de porc) cristallisée 2 x (P.M.) Worthington.

- Papaïne de latex papaya, 2x cristallisée : Worthington (P.A.P.)

- 5' mononucléotidase de venin de serpent (Crotalus adamanteus) : Worthington (V.P.H.).

- Alcool déshydrogénase de levure 2 x cristallisée : Worthington (A.D.H.L.).

2 - METHODES.

2.1 - Dosages.

2.1.1 - Dosage des nucléotides à pyridine.

2.1.1.1 - Dosage fluorométrique.

Nous avons utilisé la méthode de LOWRY et coll.[12]. Cette méthode repose sur la formation d'un produit fluorescent stable par l'action de la soude ou de la potasse 6 N sur le DPN (KAPLAN et coll., 1951)[13]. Le dosage de LOWRY permet de doser les 4 formes de coenzymes à pyridine (DPN, DPNH, TPN, TPNH) en tirant profit de la stabilité des nucléotides oxydés en milieu acide alors que les nucléotides réduits sont détruits.

2.1.1.2 - Dosage enzymatique du DPN.

Ce dosage décrit par CIOTTI et KAPLAN[7] repose sur la réduction du DPN en DPNH par l'alcool déshydrogénase en présence d'éthanol. Le DPNH formé est mesuré par son absorption dans l'U.V. à 340 mμ.

2.1.1.3 - Méthode au KCN[14].

Les nucléotides à pyridine ont la propriété de former des complexes avec le cyanure de potassium dont le spectre d'absorption déterminé au spectrophotomètre Cary est caractéristique de chacun d'eux, ainsi le DPN complexé au cyanure de potassium offre un maximum d'absorption à 327 mμ et le coefficient d'extinction à cette longueur d'onde est 5,9.

2.1.2 - Dosage colorimétrique de l'ion phosphate.

Nous utilisons la méthode de BRIGGS[15] modifiée par MACHEBOEUF et DELSAL[16] pour les quantités de phosphore comprises entre 10 et 80 µg par prise d'essai.

Pour des quantités de phosphore plus faibles de 3 à 20 µg, nous utilisons soit la méthode de BRIGGS que nous avons rendue plus sensible par réduction du volume, soit la méthode de CHEN et coll.[17] comportant une minéralisation perchlorosulfurique et utilisant pour la colorimétrie l'acide ascorbique comme réducteur.

2.1.3 - Dosage colorimétrique du désoxyribose.

Le D-2-désoxyribose est dosé par la méthode de DISCHE[18] avec la modification de BURTON[19] qui rend la réaction à la diphénylamine plus sensible et plus spécifique.

2.1.4 - Dosage colorimétrique du ribose.

Le D-ribose est déterminé selon la technique colorimétrique de MEJBAUM[20,21] basée sur la réaction de Bial.

2.1.5 - Mesure du pouvoir réducteur des oses.

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de PARK et coll.[22] qui permet de doser de 1 à 10 µg de sucre réducteur.

2.1.6 - Oxydation périodique des ribofuranosides.

La disparition du métapériodate lors de l'oxydation des ribonucléosides, à température ambiante, est suivie à 227 mμ de 2 heures jusqu'à 24 heures. Cette méthode sensible peut être appliquée à un échantillon à la concentration 0,1 μmole par ml dans une cellule de 1 cm de trajet optique.

2.1.7 - Dosage d'azote.

Il a été effectué :

- soit selon la technique de NESSLER[24],
- soit par la microméthode de KJELDAHL[25].

2.1.8 - Dosage des protéines.

Pour des quantités de protéines supérieures à 1 mg nous utilisons la méthode du biuret utilisant le réactif de GORNALL[26]; le β-mercaptoéthanol donnant une coloration parasite. Les prises d'essai sont précipitées par l'acide trichloracétique à 5 % et redissoutes dans NaOH 0,1 N avant que la coloration du biuret ne soit développée.

Pour des quantités faibles de protéines (25 μg par essai) nous utilisons soit la technique du microbiuret[27] soit la technique de LOWRY[28]. Dans ce cas également l'interférence du β-mercaptoéthanol dans la coloration est éliminée par précipitation préalable de l'échantillon par du TCA 5 %, puis redissolution dans de la soude à 10 % avant de développer la coloration.

2.1.9 - Spectre d'absorption dans l'ultra-violet : dosage spectrophotométrique des nucléotides adényliques.

Les spectres d'absorption dans l'U.V. ont été établis à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Cary. Nous avons utilisé les coefficients d'extinction moléculaire donnés par PABST[29]. Ainsi à pH 2 et à 257 mμ l'ADPR possède un coefficient d'extinction moléculaire de 14,7.

2.1.10 - Analyse des acides aminés.

Après hydrolyse acide (HCl 6 N, 20 h à 100°C), les acides aminés ont été séparés et dosés au moyen de l'autoanalyseur Technicon.

2.2 - Chromatographie sur papier.

La séparation des produits d'hydrolyse acide ou enzymatique du polyADPR est faite sur papier Whatman 1 ou 3 MM suivant la quantité du matériel à chromatographier.

2.2.1-Solvants employés.

2.2.1.1 - Chromatographie des nucléotides, nucléosides et bases.

(chromatographie descendante, 15 à 20 h à température ambiante)

-Solvant 1 (30) : acide isobutyrique/NH_4OH concentrée-/H_2O (66 : 1 : 33 ;v/v/v) pH 3,7.

-Solvant 2 (29) : alcool 95 %/acétate d'ammonium M (7 : 3 ;v/v) pH 5,0.

-Solvant 3 (31) : Sulfate d'ammonium saturé/isopropanol/H_2O (79 : 2 : 19 ;v/v/v).

2.2.1.2 - Chromatographie des oses.

(chromatographie descendante 15 h à température ambiante).

-Solvant 4 (32) : n-butanol/pyridine/eau (9 : 5 : 4; v/v/v).

-Solvant 5 (33) : isopropanol/n-butanol/eau (7 : 1 : 2; v/v/v).

2.2.1.3 - Chromatographie du ribose méthylé.

Nous avons mis au point[34] une méthode de séparation des différents diméthylriboses par chromatographie en couche mince sur film "Kodak 301 V" préalablement traité par un tampon phosphate de Na 0,2 M à pH 6,8.

Les solvants utilisés pour la chromatographie ascendante ont été :

-Solvant 6 (34) : butanol/éthanol/NH_4OH/H_2O (40 :10 :1 : 49 ; v/v/v/v).

-Solvant 7 (34) : propanol/acétate d'éthyle/pyridine/H_2O (50 : 10 : 4 : 5, v/v/v/v).

Pour la chromatographie ascendante bidimensionnelle nous avons employé successivement les solvants 8 et 9 :

-Solvant 8 (34) : propanol/acétate d'éthyle/pyridine/H_2O (50 : 10 : 4 : 5 ; v/v/v/v).

-Solvant 9 (34) : propanol/acétate d'éthyle/HCOOH/H_2O (50 : 15 : 5 : 5 ; v/v/v/v).

2.2.2 - Révélateurs chromatographiques.

2.2.2.1 - Les nucléotides, nucléosides et bases.

Sont détectés par leur absorption en lumière ultraviolette.

2.2.2.2 - Les esters phosphoriques.

Peuvent être révélés, comme le ribose-5-phosphate, par

pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD[35], $HClO_4$ 70 %, 5 ml ; molybdate d'ammonium 5 %, 20 ml ; HCl 1N, 10 ml ; H_2O,65 ml). Après pulvérisation, on sèche 10 à 15 min. à 85°C. Le $PO_4^{\equiv}$ apparaît en jaune et après exposition sous la lampe U.V. les esters phosphorés deviennent bleu .

2.2.2.3 - Les sucres réducteurs.

sont révélés par pulvérisation de phtalate d'aniline[36] (1, 69 g d'acide phtalique + 15 ml H_2O + 85 ml n-butanol + 0,93 ml d'aniline distillée).

2.2.2.4 - Les sucres méthylés.

Sont révélés par l'oxalate d'aniline[37] (butanol,80 ml ; éthanol, 50 ml ; aniline distillée, 1 ml, eau, 40 ml ; acide oxalique, 1 g.

2.2.2.5 - Les corps marqués.

Lorsqu'on emploie des corps marqués, la radioactivité des taches localisées par absorption en lumière U.V. est détectée soit par passage de la bande de chromatographie sous dérouleur de chromatogramme Nuclear Chicago, soit pour plus de sensibilité par comptage direct, au compteur Packard,des taches découpées et plongées dans du liquide de scintillation.

2.3 - Electrophorèse sur papier.

Dans certains cas, nous avons séparé les nucléotides par électrophorèse sur papier à haute tension,2500 volts/cm, 10 mA, 60 min. à 0°, dans le tampon carbonate de lithium 0,004 M, acide acétique 0,1 M, pH 3,5.

2.4 - Chromatographie sur colonne.

2.4.1- Chromatographie des nucléotides sur colonne de Dowex 1 X 2 ou 1 X 8.

Nous avons utilisé les techniques décrites par CHAMBON et MANDEL[38].

2.4.2- Préparation de la DEAE cellulose.

100 g de DEAE cellulose (Kodak) sont lavés par 3 litres de NaOH 1N, 15 h. On répète en laissant déposer 24 h jusqu'à ce que le surnageant soit clair.

On lave avec de l'eau distillée, en laissant reposer 2 à 3 h jusqu'à ce que le pH soit neutre, en éliminant les particules légères. On lave rapidement sur Büchner avec 4 litres d'HCl 0,5 N, puis avec de l'eau distillée dans un Erlenmeyer jusqu'à ce que le pH soit celui de l'eau. La cellulose est conservée à 4°, en présence de quelques gouttes de butanol. Avant utilisation, la DEAE cellulose est équilibrée avec le tampon qui contiendra l'échantillon à chromatographier.

2.4.3- Colonne d'hydroxylapatite.

L'hydroxylapatite est préparée selon la technique de TISELIUS, HJERTEN et LEVIN[39], modifiée par LEVIN[40] et stockée à 4°C. Avant utilisation l'hydroxylapatite est mise en colonne et équilibrée avec le tampon d'élution.

2.4.4- Colonne de CM cellulose.

La CM cellulose (SERVA) est préalablement lavée à l'eau (les petites particules étant éliminées par décantation), traitée par de la soude 0,02 N, lavée jusqu'à pH 5,0 avec de l'eau distillée puis mise sous HCl 0,02 N et relavée avec de

l'eau distillée jusqu'à pH 5,0. La CM cellulose ainsi traitée est conservée à 4° avec quelques gouttes de butanol. Avant utilisation elle est équilibrée avec le tampon contenant l'échantillon à chromatographier.

2.5 - Méthylation du ribosyladénosine issu du pseudoADPR.

Nous avons mis au point une technique de méthylation[34] du ribose nucléotidique en modifiant la méthode de KUHN et BROSSMER[41]. En effet le ribosyladénosine, ainsi que les 2'AMP et 3'AMP qui nous ont servi de témoins, sont insolubles dans la diméthylformamide et l'iodure de méthyle. Pour obtenir une méthylation totale des oxhydriles libres, nous avons utilisé le diméthylsulfoxyde comme solvant et effectué 20 méthylations successivement avec de l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent (PURDIE et IRVINE[42]).

Processus opératoire :

2.5.1 - Méthylation.

Dans un Erlenmeyer à col rodé, on dissout la substance à méthyler dans du diméthylsulfoxyde (environ 10 ml). On y ajoute environ 15 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent (fraîchement préparé). L'Erlenmeyer est muni d'un réfrigérant à eau et la solution est agitée à l'obscurité à l'aide d'un barreau magnétique ; après 15 h on ajoute 10 ml d'iodure de méthyle et 3 g d'oxyde d'argent, puis on agite à nouveau 15 h à l'abri de la lumière.

Le mélange est ensuite filtré et le filtrat extrait au chloroforme à froid ; on filtre à nouveau puis, dans une ampoule à décanter, on élimine l'iode libéré et l'argent par

lavage à l'hyposulfite de sodium, puis à l'eau distillée. On élimine les traces d'eau par du sulfate de sodium, puis on concentre en distillant la majeure partie du chloroforme. On teste le degré de méthylation des ribosides après hydrolyse acide (voir plus loin) et chromatographie.

Les opérations précédentes ont du être répétées 20 fois pour que la méthylation des ribosides soit totale.

2.5.2 - Hydrolyse acide.

Celle-ci hydrolyse les liaisons ribofuranosides.

On transvase dans un petit tube conique à rodage muni d'un réfrigérant, on évapore à sec au bain-marie bouillant et le résidu est repris par l'éthanol. On évapore l'alcool, on hydrolyse par 15 ml de SO_4H_2 0,5 N, 5 h à 100°, on neutralise par du carbonate de strontium pur, sec et on filtre.

2.5.3 - Purification.

Le filtrat contenant les dérivés méthylés est chauffé à 50° avec du charbon Norit x 50, puis filtré et concentré. Les sucres méthylés sont ensuite purifiés par chromatographie ascendante 15 h sur papier Whatman 1 dans l'ammoniaque concentrée 34 %. Dans ces conditions les riboses méthylés ne migrent pas. On les élue par l'alcool qui est ensuite évaporé et on reprend dans l'eau distillée pour traiter à nouveau par le charbon ; le filtrat est distillé à sec.

2.5.4 - Chromatographie des dérivés méthylés.

Le résidu méthylé repris dans de l'alcool est chromatographié sur plaque "Kodak 301 V". Les solvants 6, 7, 8 et 9 ont été utilisés pour séparer les isomères de diméthylribose.

2.6 - Préparation des noyaux de foie de poulet.

2.6.1 - Méthode de CHAUVEAU[43].

Nous avons utilisé la méthode de CHAUVEAU[43]. Après le sacrifice des animaux, les foies sont aussitôt prélevés sur de la glace, nettoyés puis broyés à l'aide d'un Ultraturrax dans 4 volumes de saccharose 2,38 M $MgCl_2$ 0,001 M, succinate de posassium 0,001 M, pH 6,0, de façon à obtenir une solution de densité finale 1,28. Seuls les noyaux sont déposés par centrifugation à 44.300 g dans un Rotor 21 de Spinco (75 min.). Le rendement moyen est d'environ 50 %.

Les noyaux peuvent être stockés à -20° quelques semaines sans grande perte d'activité.

2.6.2 - Méthode de CHAUVEAU, modifiée par ZALTA[44].

Dans un certain nombre d'expériences, les noyaux ont été purifiés en utilisant la technique de CHAUVEAU, modifiée par ZALTA[44] qui livre des noyaux très purs.

Les foies sont homogénéisés dans 15 à 20 volumes de saccharose 2,2 M contenant 0,001 M de chlorure de calcium, dans un apparail de Potter-Thomas. Après homogénéisation, on ajoute 1/10 du volume d'une solution aqueuse à 1,5 p.cent de nonyl-phénol-polyoxyéthylène à 6 molécules d'oxyde d'éthylène (Cémulsol NPT 6). Les culots de noyaux sont recueillis après centrifugation de 50 min. à 78.400 g dans un Rotor 30 de Spinco et repris dans du saccharose 2,2 M, $CaCl_2$ 0,001M, auquel on ajoute le 1/10 du volume de nonyl-phénol-polyoxyéthylène à 12 molécules d'oxyde d'éthylène à 1,5 p.cent (Cémulsol NPT 12) sous agitation constante. Les noyaux récupérés après

une centrifugation de 50 min. à 78.400 g sont repris dans du saccharose 2,2 M, $CaCl_2$ 0,001 M et recentrifugés dans les mêmes conditions que précédemment.

Les noyaux ainsi préparés ont une activité légèrement inférieure à celle des noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU classique.

2.7 - Préparation des nucléoles.

Dans chaque expérience, 15 rats de 200 g environ ont été sacrifiés ; les foies prélevés aussitôt dans du saccharose 0,25 M sont broyés dans dix fois leur volume de saccharose 2,4 M, $CaCl_2$, 0,0033 M dans un homogénéiseur de type Potter.

Les noyaux sont déposés par centrifugation 60 min. à 44.300 g dans un Rotor 21 de Spinco. Les nucléoles de ces noyaux sont alors préparés selon la technique de BUSCH et coll.[45] par sonnation en milieu saccharose 0,34 M (1 ml/g foie). L'effet des ultra-sons est suivi par l'examen microscopique d'une partie aliquote.

Après libération des nucléoles par les ultra-sons, le sonnat est déposé par fraction de 20 ml sur une couche de 20 ml de saccharose 0,88 M et centrifugé à 2000 g pendant 20 min. à 0°. Le culot de nucléoles est remis en suspension dans du saccharose 0,34 M et recentrifugé sur du saccharose 0,88 M dans les mêmes conditions.

Cette opération de purification est répétée jusqu'à ce que l'image microscopique soit satisfaisante (voir photo ci-contre).

2.8 - Essais enzymatiques.

2.8.1 - Conditions d'incubation pour la synthèse du poly ADPR.

La composition du milieu d'incubation est la suivante : (volume final 0,25 ml) Tampon glycocolle-NaOH, pH 8,6 0,1 M ; $MgSO_4$ 0,03 M ; β-mercaptoéthanol 0,01 M ; ATP 1 mM ; NMN 1 mM (l'un d'entre eux étant marqué) ou bien DPN marqué 1 mM ; extrait enzymatique (1 à 2 mg de protéines lorsqu'il s'agit d'extraits nucléaires non purifiés).

Tous les composants du milieu d'incubation sont multipliés par 100 lorsqu'on veut obtenir du polyADPR en quantité pondérale.

La réaction est arrêtée après 20 min. à 37° par addition d'acide trichloracétique 10 % -. pyrophosphate de Na 0,02 M à 0°.

Le produit acido-insoluble est isolé :

- soit par filtration sur filtre Whatman GF/C de diamètre 24 mm, lavages répétés avec du TCA 5 % puis séchage par un mélange d'alcool-éther(1 :1 ; v/v).

- soit par centrifugation pendant 10 min. à 4000 g à 4°, lavages au TCA 5 % deux fois, redissolution dans du phosphate double de sodium et d'ammonium 1 M et reprécipitation par le TCA 5 %.

La radioactivité incorporée dans le composé acido-insoluble est déterminée par comptage direct des filtres ou des culots de centrifugation dissous dans l'hydroxyde d'hyamine.

Nous utilisons un compteur à scintillation Packard-Tricarb 314 EX et un mélange de scintillation contenant 6 g de 2,5 diphényl-oxazole + 0,3 g de diméthyl POPOP (1 - 4-bis 2-(4 méthyl-5-phényloxazozyl)-benzène) par litre de toluène.

Les résultats sont exprimés en µmoles de nucléotide radioactif incorporé dans un matériel acido-insoluble et nous définissons l'unité d'activité enzymatique comme étant la quantité d'enzyme assurant la transformation en matériel acido-insoluble de 1 mµmole d'ADPR en 20 min. à 37°.

2.8.2 - Conditions de l'hydrolyse pyrophosphatasique.

L'hydrolyse du polyADPR ou du DPN par la pyrophosphatase contenue dans la préparation commerciale de phosphodiestérase de venin de serpent se fait dans le milieu suivant et à 37° : Tampon glycocolle - NaOH 0,05 M pH 8,2, acétate de magnésium 0,01 M. En cours d'hydrolyse, le pH est maintenu à 8,0 par NaOH N. Dans ces conditions, 1 mg de polyADPR est totalement hydrolysé après 60 min. à 37° en présence de 150 µg d'enzyme.

2.8.3 - Conditions de l'hydrolyse par la 5'mononucléotidase.

La 5' nucléotidase contenue dans une préparation commerciale de venin de serpent est utilisée pour identifier le 5'AMP. L'hydrolyse est réalisée à 37° dans le milieu suivant (volume final 0,8 ml) : Tampon véronal, soude 0,05 M, pH 9,4) $MgCl_2$ 0,01 M.

Dans ces conditions, le phosphate de 2,0 µmoles de 5'AMP est complètement libéré en 60 min., en présence de 1,0 mg de venin de serpent.

2.3.2 - Conditions de l'hydrolyse par la phosphatase alcaline d'intestin de poulet.

La phosphatase alcaline d'intestin de poulet nous a permis d'hydrolyser certains esters phosphoriques. Les conditions d'incubation à 37° sont les suivantes (volume final 1,5 ml tampon glycocolle-NaOH 0,1 M, pH 8,5, $MgCl_2$ 0,01 M. Dans ces conditions 2 µmoles de pseudoADPR sont complètement transformées en ribosyladénosine en 60 min. en présence de 0,5 mg de phosphatase.

2.3.3 - Conditions d'hydrolyse par les enzymes nucléolytiques.

Les DNase et RNase de pancréas de boeuf ont été utilisées dans les conditions suivantes : tampon glycocolle NaOH 0,05 M pH 8,6, $MgCl_2$ 0,01 M, à 37° dans les proportions d'environ 1 mg de DNase ou de RNase pour 25 mg de DNA ou de RNA nucléaire.

La RNase T_1 est incubée dans un tampon Tris (HCl) 0,015 M pH 7,4 - EDTA 0,001 M, volume final 0,25 ml. Dans ce milieu 1 µg de RNase T_1 catalyse l'hydrolyse en produit acidosoluble de 1 mg de RNA de levure en 30 min. à 37°.

La RNase T_2 est utilisée en tampon acétate de sodium 0,05M pH 4,5 - EDTA 0,002 M dans un volume final de 1 ml ; dans ces conditions, 2 unités de RNase T_2 catalysent l'hydrolyse de 80 µg d'acide polyadénylique en 30 min. à 37°.

2.3.4 - Conditions d'hydrolyse par les enzymes protéolytiques.

Les enzymes protéolytiques, trypsine et chymotrypsine cristallisées, pronase B,sont incubés 60 min. à 37° en tampon

acétate d'ammonium 1 %, pH 7,4 en présence de $MgCl_2$ 0,01 M dans les proportions de 1 mg d'enzyme/ 100 mg de protéines. La papaïne est incubée 90 min. à 37° en tampon acétate à pH 5,0 en présence de B.A.L. 10 %.

2.9 - Préparation des extraits enzymatiques.

Les noyaux correspondent à 20 g de foie et, préparés selon la méthode décrite précédemment, sont lysés à 2° grâce à un homogénéiseur de type Potter dans 20 ml de tampon glycocolle NaOH 0,05 M, pH 8,6 - β-mercaptoéthanol 0,01 M - $MgCl_2$ 0,03 M.

Après 15 min. à 2°, l'homogénat est centrifugé 15 min. à 4.500 g (dans un centrifugeur de type Jouan G 60).

Le culot de centrifugation est remis en suspension, en s'aidant d'un homogénéiseur Potter, dans 10 ml de tampon glycocolle-NaOH 0,05 M, pH 8,6 - β-mercaptoéthanol 0,01 M. La concentration en protéines de l'extrait enzymatique (enzyme agrégée) ainsi obtenu est de 15 à 20 mg/ml.

3 - PRODUITS CHIMIQUES UTILISES.

- Polyéthylène Sulfonate (sodium) (P.E.S.) PM:12900 -Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, U.S.A.
- Héparine (sel de sodium) 127 U.I./mg, S.G. 830, 31604 - Roussel, Uclaf, Paris.
- Dextran Sulfate 5 - 40 S, P.M.: 5-40 millions- Sigma.
- Dextran Sulfate 500 S, P.M.: 500 000- Sigma.
- Acide Poly-uridylique (ammonium) S = 6,16 -catalogue n° 43537, Miles Chemical Company, Clifton, New Jersey,U.S.A.
- Acide Désoxyribonucléique (sodium), Type I de thymus de veau- Sigman 500 S.
- Acide désoxyribonucléique (Thymus de veau) - Worthington, code DNA.
- Acide ribonucléique (de levure) - Worthington, code RNA.
- DPN, Coenzyme 1 - catalogue n° 300, PL Biochemicals Inc., Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.
- Adénosine 5'Diphosphoribose : ADPR - catalogue n° 4400, PL Biochemicals Inc. Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.
- 2'AMP, 3'AMP de levure , 5'AMP de muscle - Sigma.
- ADP de muscle de cheval - Sigma.
- Adénosine - Sigma Grade (Pfs).
- Adénine - Sigma Grade, cristallisée.

2ème Partie

PURIFICATION ET STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR

1 - MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION DE POLYADPR IN VITRO.

1.1 - Choix du tissu et des animaux.

Ainsi que nous l'avons rappelé dans l'introduction, CHAMBON et coll.[3] observèrent que l'addition de NMN à un milieu d'incubation destiné à mesurer l'activité de la RNA polymérase agrégée[2], provenant de noyaux de foie de rat ou de poulet, provoquait une stimulation très importante de l'incorporation de la radioactivité du $[\alpha\text{-}P^{32}]$ ou $[C^{14}]$ ATP dans un produit acido-insoluble et cela même en l'absence des autres nucléosides triphosphates (Tableau I). Une identification préliminaire avait suggéré que ce produit acido-insoluble pourrait être du polyA.

Lorsque nous avons repris les recherches sur ce composé acido-insoluble et décidé d'en étudier la structure en détails, nous avons d'abord cherché quelle pourrait être la meilleure source en enzyme catalysant cette réaction. Le tableau I rapporte les résultats de nos essais.

Nous constatons que, si la stimulation de l'incorporation d'ATP marqué en présence de NMN est sensiblement équivalente dans les extraits nucléaires de foie de rat et de porc, elle est plus faible dans les extraits du thymus de veau et nulle avec les extraits d'E.coli. Par contre, elle est très

TABLEAU I

INCORPORATION DE $[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP OU $[C^{14}]$ATP EN PRESENCE DE NMN PAR DES EXTRAITS ENZYMATIQUES D'ORIGINES DIVERSES

Origine de l'extrait enzymatique	Précurseur radioactif	NMN dans le milieu d'incubation	Activité* mμmoles incorporées par mg protéines
Noyaux de Foie de Rat	$[C^{14}]$ATP	- NMN	0,092
	$[C^{14}]$ATP	+ NMN	1,810
Noyaux de Thymus de Veau	$[C^{14}]$ATP	- NMN	0,008
	$[C^{14}]$ATP	+ NMN	0,084
Noyaux de Foie de Porc	$[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP	- NMN	0,100
	$[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP	+ NMN	1,610
Noyaux de Foie de Poulet	$[C^{14}]$ATP	- NMN	0,048
	$[C^{14}]$ATP	+ NMN	10,300
Extrait brut d'E.coli	$[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP	- NMN	0,113
	$[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP	+ NMN	0,105

* Voir sous "Matériel et Méthodes".

importante dans les extraits de foie de poulet qui présentent également l'activité la plus élevée. Cette nette différence entre les activités des noyaux de poulet et de rat ainsi que des considérations financières et culinaires nous incitèrent à travailler sur le foie de poulet plutôt que sur le foie de rat.

1.2 - Nature des éléments de l'ATP, du NMN et du DPN incorporés dans le matériel acido-insoluble.

La NMN adénylyltransférase de KORNBERG[6] ayant été localisée chez les animaux dans les noyaux par HOGEBOOM et coll.[46], l'augmentation d'incorporation de la fraction adénylique de l'ATP en présence de NMN n'était-elle pas le fait de deux réactions enzymatiques dont la première aurait catalysé la synthèse de DPN marqué à partir d'ATP marqué et de NMN ? Cette hypothèse fut confirmée par l'incorporation de DPN marqué en utilisant les mêmes extraits enzymatiques nucléaires de foie de poulet (Tableau II).

TABLEAU II

INCORPORATION DU $[P^{32}-P^{32}]$DPN DANS LE PRODUIT ACIDO-INSOLUBLE PAR UN EXTRAIT NUCLEAIRE DE FOIE DE POULET

Précurseurs	mμmoles incorporées/ mg de protéines	
	Expérience 1	Expérience 2
$[\alpha-P^{32}]$ATP + NMN	8,9	12,4
$[P^{32}-P^{32}]$DPN	23,0	22,2

TABLEAU III

ELEMENTS DE L'ATP, DU NMN OU DU DPN INCORPORES DANS LE MATERIEL ACIDO-INSOLUBLE

Précurseurs	mμmoles incorporées/mg de protéines (extrait nucléaire de foie de poulet)
[C^{14}]ATP ou [α-P^{32}] ATP	0,01
[C^{14}]ATP ou [α-P^{32}] ATP + NMN	15,30
[P^{32}]NMN + ATP	16,30
[ribose-C^{14}] NMN + ATP	17,25
[nicotinamide-C^{14}] NMN + ATP	0,37*
[P^{32}-P^{32}]DPN	33,60
[ribose-C^{14}] DPN	33,50
[nicotinamide-C^{14}]DPN	0,27*

*Ces valeurs ne sont pas significatives car très proches du mouvement propre.

Cette observation nous incita à étudier l'incorporation des différents éléments constitutifs de l'ATP, du NMN et du DPN en utilisant des molécules marquées dans leurs divers composants.

Le tableau III montre que la moitié adénylique de l'ATP, aussi bien que le ribose et le phosphate du NMN sont incorporés dans le produit acido-insoluble alors que la fraction nicotinamide du NMN n'est pas incorporée. D'autre part, l'ensemble des résultats obtenus par l'incorporation de molécules marquées nous ont amenés à conclure que le DPN est le précurseur direct du polymère acido-insoluble et que seule sa fraction ADPR est incorporée.

En effet :

- les radioactivités des $[p^{32}\text{-}p^{32}]$ DPN ou [ribose C^{14}] DPN sont incorporées en quantités égales alors que la nicotinamide du DPN n'est pas incorporée (Tableau III).

- le DPN est un meilleur précurseur que l'ATP plus NMN (Tableau II et III).

- l'addition de DPNase de rate de boeuf au milieu d'incubation réduit considérablement l'incorporation d'ATP marqué en présence de NMN ou de DPN marqué (Tableau IV).

- l'addition de DPN non radioactif réduit l'incorporation de $[\alpha\text{-}P^{32}]$ ATP en présence de NMN ce qui est compatible avec l'existence au cours de la production du polymère d'une étape intermédiaire correspondant à la synthèse du DPN. Toutefois l'ADPR libre n'est pas un intermédiaire car l'addition d'ADPR froid au milieu d'incubation ne réduit pas l'incorporation de

TABLEAU IV

EFFET DE DPNase, DE DPN FROID OU D'ADPR FROID SUR L'INCORPORATION DE $[p^{32}]$DPN OU $[\alpha\text{-}p^{32}]$ATP

Précurseurs	Conditions d'incubation	mμmoles incorporées/mg de protéines (extrait nucléaire de foie de poulet)
$[p^{32}\text{-}p^{32}]$ DPN	Standard**	34,4
"	+ DPNase de rate de boeuf ajoutée avant incubation	1,4
"	+ DPNase de rate de boeuf ajoutée après incubation (15 min., 37°)	34,5
$[\alpha\text{-}p^{32}]$ ATP+NMN	Standard	15,35
"	+ DPNase de rate de bœuf ajoutée pendant l'incubation	2,64
"	+ DPNase de rate de bœuf ajoutée après incubation (15 min., 37°)	20,00
"	+ 0,5 μmole de DPN non radioactif dans l'incubation	2,30
$[p^{32}\text{-}p^{32}]$ ADPR	Standard	0,40*
$[p^{32}\text{-}p^{32}]$ DPN	+ 0,25 μmole d'ADPR non marqué dans l'incubation	38,00

* Cette valeur n'est pas significative car très proche du mouvement propre.

** Voir "Matériel et Méthodes".

la radioactivité du $[P^{32}]$DPN et le $[P^{32}-P^{32}]$ADPR n'est pas incorporé (Tableau IV).

Pour exclure la possibilité d'une formation intermédiaire de DPNH suivie de détachement de la dihydronicotinamide pendant la précipitation acide et absorption éventuelle de l'ADPR sur le précipité acido-insoluble, l'arrêt de la réaction et les lavages ont été réalisés avec du sulfate d'ammonium saturé à la place du TCA 10 %. Dans ces conditions, la radioactivité incorporée dans le matériel précipité par le sulfate d'ammonium est identique à celle précipitée par le TCA et il n'y a pas non plus d'incorporation de la radioactivité de la nicotinamide. Nous avons également observé que même dans le milieu d'incubation le produit formé était insoluble et qu'il était possible de le laver par un tampon identique à celui du milieu d'incubation.

L'ensemble de ces observations permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas d'une simple adsorption d'ADPR sur un produit acido-insoluble. D'ailleurs, le $[P^{32}-P^{32}]$ADPR ajouté au milieu d'incubation est parfaitement éliminé par les lavages auxquels nous procédons et la radioactivité acido-insoluble n'est pas enlevée par des lavages répétés avec de l'ADPR non radioactif, par dialyse ou électrodialyse prolongée ou par incubation dans l'urée 8 M à 37° pendant 30 min.

Les résultats acquis en suivant l'incorporation de la radioactivité des constituants du DPN permettent donc d'affirmer que la fraction ADPR de la molécule de DPN est transformée en un produit insoluble tandis que la fraction

TABLEAU V

EFFET DES ENZYMES NUCLEOLYTIQUES ET PROTEOLYTIQUES SUR LA RADIOACTIVITE ACIDO-INSOLUBLE APRES INCUBATION AVEC L'EXTRAIT NUCLEAIRE BRUT EN PRESENCE DE [P^{32}-P^{32}]DPN

Conditions d'incubation		Post-traitement	mμmoles acido-insolubles pour une incubation
Milieu	Durée de l'incubation à 37°		
Standard*	1 h.	--	185
Standard	1 h.	Addition de RNase (50 μg/ml) et de DNase (50 μg/ml) 40 min. à 37°	175
Standard	1 h.	Trypsine + chymotrypsine (50 μg/ml de chaque) 1 h. à 37°	88

* Voir "Matériel et Méthodes".

nicotinamide est libérée. Toutefois ces résultats ne nous renseignent pas sur le mécanisme par lequel ces résidus ADPR sont rendus insolubles et en particulier, s'il s'agit d'une polymérisation des unités ADPR avec formation d'un polyADPR ou d'une liaison éventuelle de résidus ADPR à d'autres macromolécules elles-mêmes acido-insolubles.

Pour essayer d'exclure cette dernière éventualité nous avons, après incubation, procédé à des traitements par des enzymes nucléolytiques et protéolytiques. Le tableau V montre qu'environ 50 % de la radioactivité demeurent acido-insoluble après ces traitements.

Ces observations nous indiquaient une voie possible pour purifier le produit de la réaction et,par là même,permettre une analyse de sa structure.

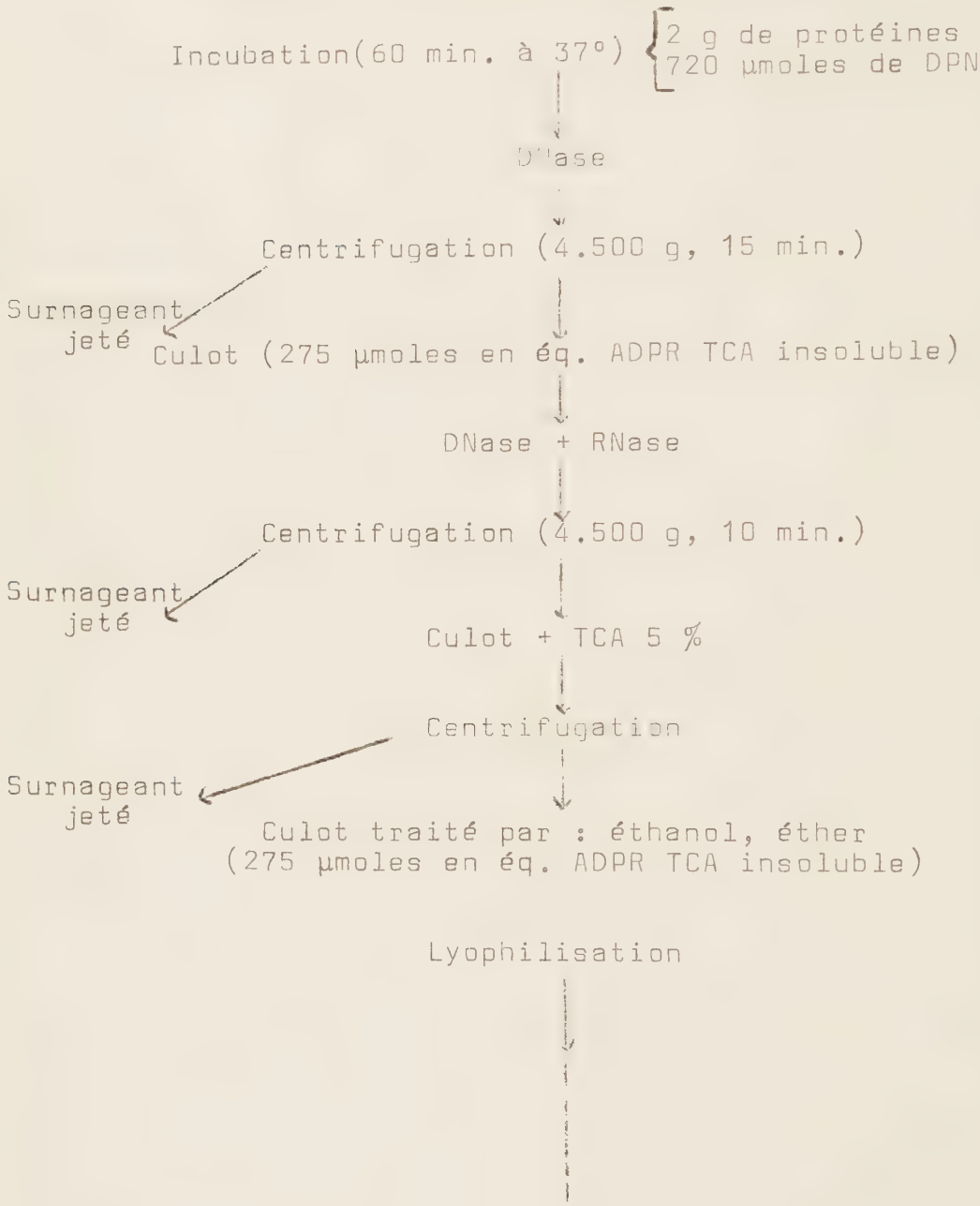
2 - PURIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VITRO.

Pour la commodité de l'exposé nous appelons dès maintenant le produit acido-insoluble polyADPR sans pour autant préjuger de sa structure.

La méthode de purification est fondée sur la résistance du polyADPR aux enzymes nucléolytiques. Pour hydrolyser les protéines deux méthodes sont utilisées : soit une protéolyse, soit des extractions répétées au phénol. La purification poussée du polyADPR est ensuite aisée en mettant à profit son insolubilité sous forme de sel de magnésium. Après une incubation de 60 min. à 37° dans les conditions précisées sous "Matériel et Méthodes" le polyADPR qui, dans certaines

SCHEMA 1

SCHEMA DE LA PURIFICATION DU POLYADPR



préparations est marqué en prenant du DPN radioactif comme substrat, est purifié selon le schéma I.

2.1 - Traitement par les enzymes nucléolytiques.

On ajoute 50 µg/ml de DNase et on incube 30 min. à 37°C, pour éliminer le DNA qui se trouve dans l'extrait enzymatique nucléaire. On centrifuge à 5000 g pendant 10 min. pour enlever les constituants solubles du milieu (excès de substrat, désoxyribonucléotides provenant de l'hydrolyse du DNA protéines solubilisées lors de l'hydrolyse du DNA), le polymère restant insoluble.

Le culot de centrifugation remis en suspension dans 80 ml de tampon glycocolle - NaOH 0,05 M pH 8,6, mercaptoéthanol 0,001 M, est hydrolysé 40 min. à 37° par la DNase (50 µg/ml) et la RNase (50 µg/ml) pour éliminer le DNA résiduel et le RNA présent dans la préparation enzymatique.

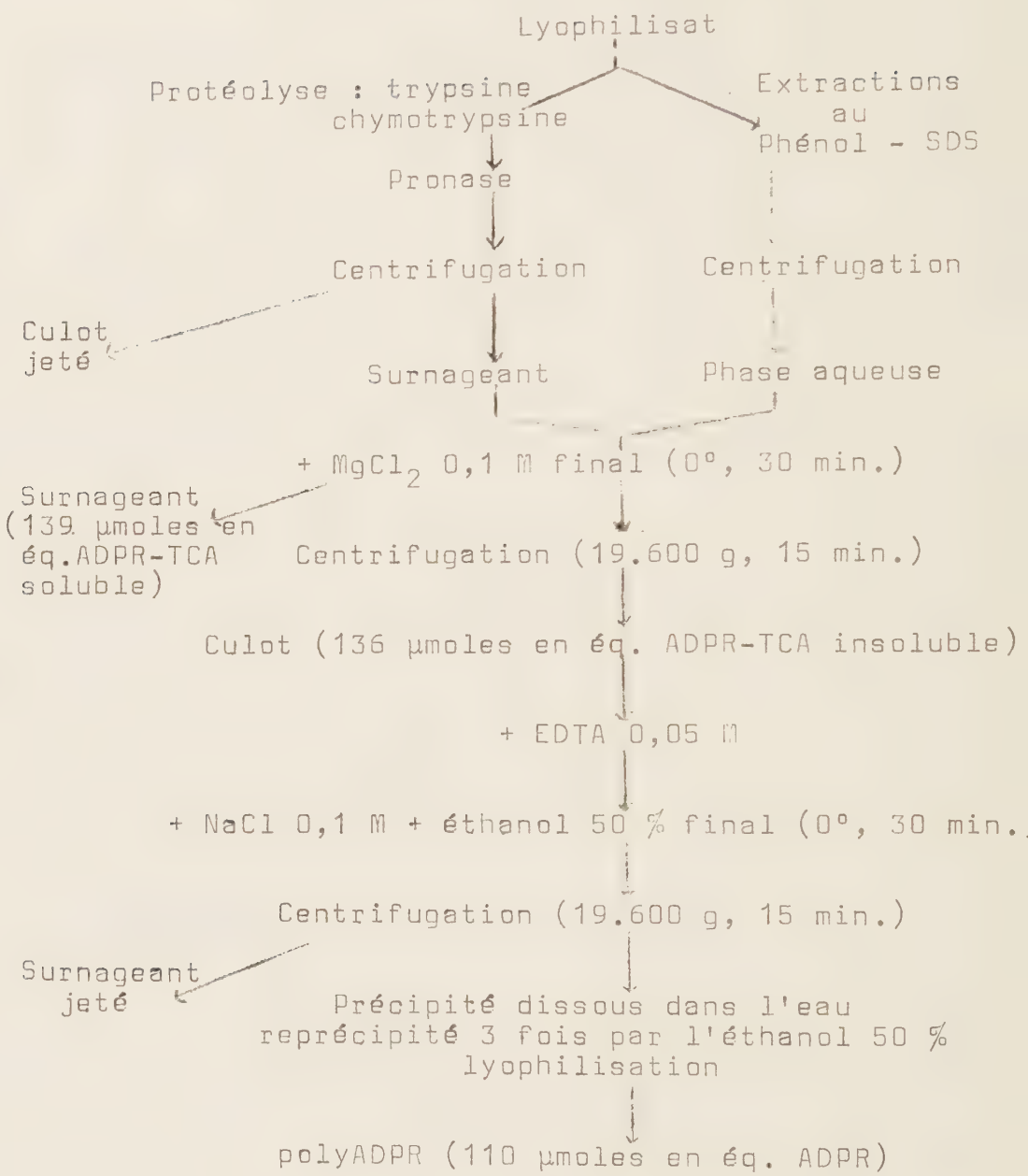
2.2 - Lavage par l'acide trichloracétique.

Après centrifugation, le culot est lavé par du TCA 5 % - pyrophosphate de sodium 0,02 M et séché par un traitement à l'alcool froid et un lavage à l'éther froid. Le résidu est ensuite séché à l'air ou lyophilisé.

2.3 - Déprotéinisation.

Dans le résidu sec le polyADPR qui est lié à des protéines est insoluble en tampon aqueux. Pour le solubiliser et se débarrasser des protéines, deux variantes ont été utilisées :

SCHEMA 1 (suite)



2.3.1 - Protéolyse.

Pour hydrolyser les protéines, le produit lyophilisé est mis en suspension dans du tampon acétate d'ammonium 1 % pH 7,4 (70 ml) et hydrolysé 60' à 37° C par 50 µg/ml de trypsine et 50 µg/ml de chymotrypsine.

Après une centrifugation de 15 min. à 4.500 g le surnageant contenant le polyADPR est conservé et on complète la protéolyse du culot par un traitement à la Pronase (100 µg/ml) en tampon acétate d'ammonium 1 % à pH 7,4 pendant 60 min. à 37°C.

Après centrifugation les deux surnageants sont réunis. Dans nos conditions de protéolyse 95 % du polyADPR sont rendus hydrosolubles.

2.3.2 - Extraction au phénol.

Pour certaines préparations la déprotéinisation enzymatique a été remplacée par une extraction à 4° et à pH 8,0 avec du phénol 90 % - SDS 1,5 % suivie de 3 extractions au phénol à 90 % à pH 8,0.

2.4 - Précipitations par le chlorure de magnésium et l'éthanol 50 %.

Le surnageant de protéolyse ou la phase aqueuse après extraction au phénol est rendu $MgCl_2$ 0,1 M. Dans ces conditions, le polyADPR précipite (30 min. à 0°) et est recueilli par centrifugation à 19.600 g pendant 15 min. (Rotor 30 Spinco). Le précipité translucide est ensuite dissout dans l'EDTA 0,05M et purifié par 3 à 5 cycles de précipitations par l'éthanol 50 % et redissolution dans l'eau distillée.

PROFIL DE SÉDIMENTATION DU POLYADPR

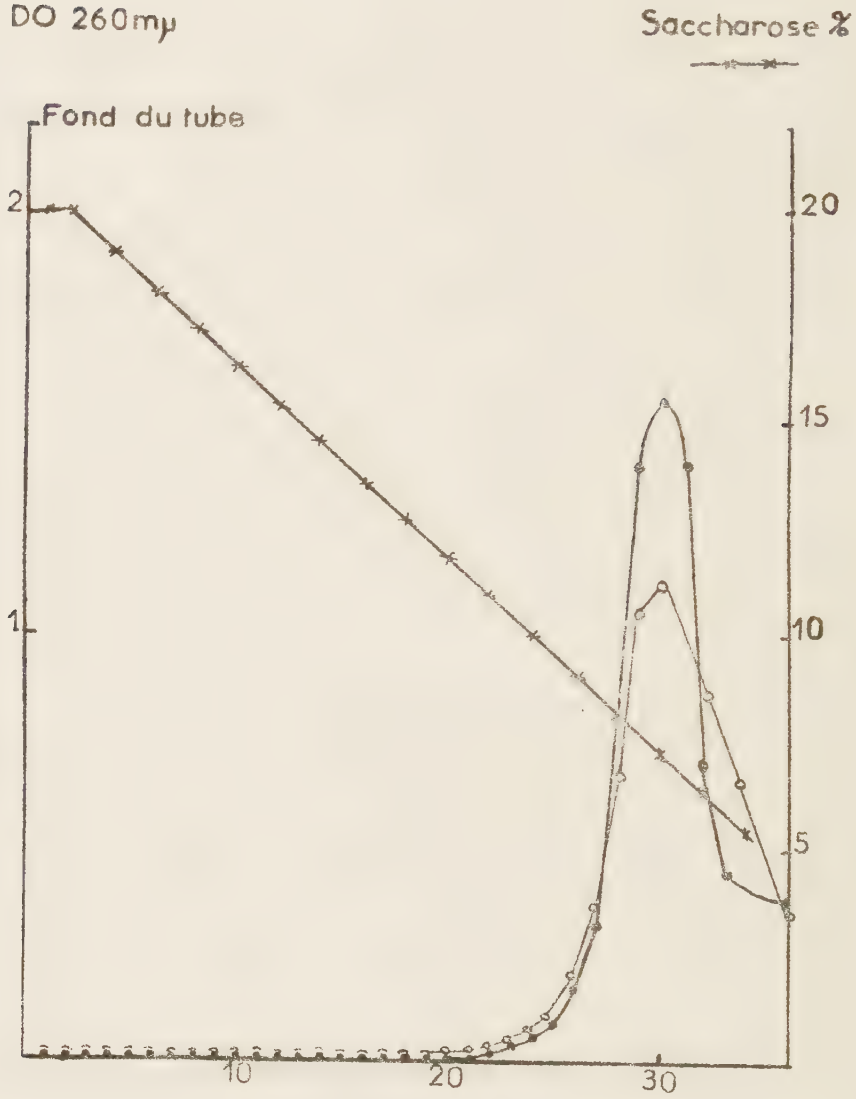


FIGURE 1a. - Profil de sédimentation du polyADPR dans gradient de saccharose.

2 mg de polyADPR sont déposés sur un gradient de sacc 5 à 20 % et centrifugés pendant 16 h à 25.000 tours/m dans un rotor SW 25. Du tRNA de cristallin de veau (d Melle Virmaux) a été centrifugé dans les mêmes condit dans un autre godet du rotor.

—●—● absorption dans l'U.V. du tRNA.

—○—○— absorption dans l'U.V. du polyADPR.

—×—× concentration en saccharose (%).

Le précipité final est ensuite lyophilisé. Le polyADPR purifié se présente sous forme d'une poudre blanche. Le rendement de la purification est d'environ 30 à 40 % en équivalent ADPR acido-insoluble et est sensiblement le même que l'on utilise pour la déprotéinisation les enzymes protéolytiques ou le phénol.

La perte la plus importante en matériel acido-insoluble survient lors de la précipitation par le magnésium. La déprotéinisation qui précède cette étape libère donc sous forme acido-soluble une fraction du matériel initialement acido-insoluble dont l'insolubilité est vraisemblablement due à la formation de complexe avec des protéines ~~basiques~~. Nous discuterons plus loin la nature possible de cette fraction.

3 - CARACTERISTIQUES DU POLYADPR.

3.1 - Propriétés physico-chimiques.

Le produit purifié précipite en milieu acide (TCA 5 %, HCl 0,01 N, $HClO_4$ 0,6 N), dans l'éthanol 50 % et est précipitable sous forme de sel de magnésium. Il est exclu par les Sephadex G 25 et G 50 et il sédimente en gradient de saccharose comme les RNA de transfert (Figure 1a).

Le spectre d'absorption dans l'U.V. est semblable à celui de l'ADPR. Il n'est ni dialysable, ni électrodialysable ; le polyADPR présente une hypochromicité d'environ 20 %, objectivée lors de son hydrolyse par la pyrophosphatase (voir p. 38).

En chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose en présence d'urée 7 M, le polyADPR est élué comme un large pic

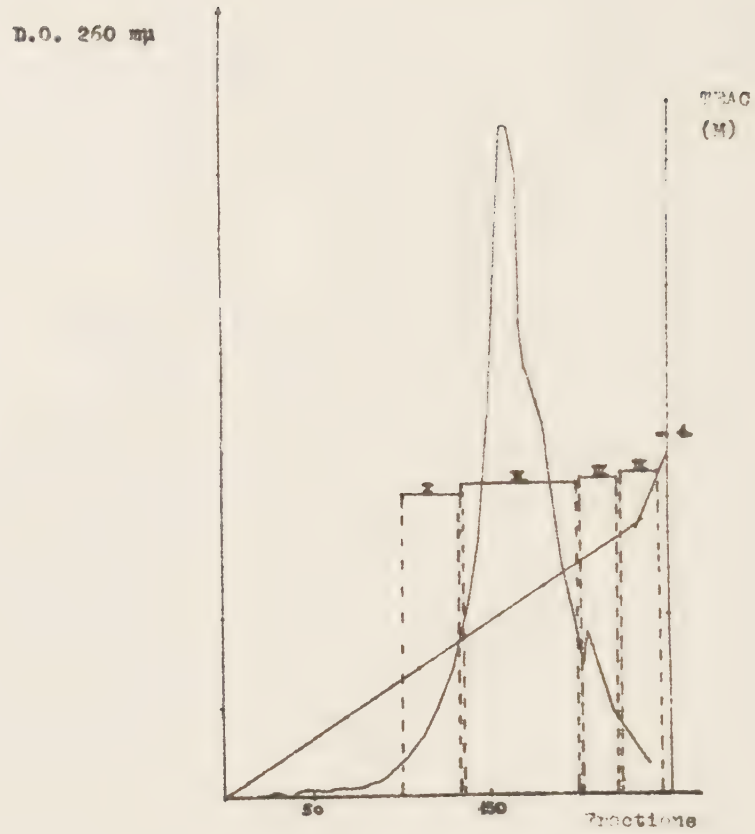


FIGURE 1. - Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (3,8 x 1,8 cm) de 180 µmoles de polyADPR synthétisé in vitro ; élution par un gradient linéaire de carbonate de triéthylamine (TEAC) pH 8,6, urée 7M : 750 ml TEAC 0,01 M, urée 7 M + 750 ml TEAC M - urée 7 M jusqu'au tube n° 245 ; puis au tube 250 élution avec TEAC 2,5 M.
Débit : 36 ml/heure ; volume d'une fraction : 6 ml.

assymétrique entre des concentrations de carbonate de triéthy amine de 0,3 M et 0,8 M (Figure 1). Cette polydispersité relative du polyADPR nous a incitée à fractionner le pic en 4 portions pour en faire l'analyse ultérieure. Les fractions I,II, III et IV correspondent respectivement à 8,7 %, 80,8 %, 7,5 % et 3,0 % du polyADPR mis initialement sur la colonne.

3.2 - Etude analytique.

3.2.1- Analyse chimique du polyADPR.

L'analyse des constituants du produit purifié par protéolyse ou extraction au phénol, indique une constitution identique à celle de l'ADPR avec environ une molécule d'adénine pour deux molécules de ribose et deux molécules de phosphate (Tableau VI).

TABLEAU VI

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DU POLYADPR

Substances	µmoles ou µatomes
Ribose	1,91
Phosphore	2,00
Adénine*	0,78
Azote	6,10

*En utilisant le coefficient d'extinction molaire de l'ADPR $14,7 \times 10^3$ à 160 mµ.

La relative faiblesse du taux d'adénine est due à l'utilisation du coefficient d'extinction moléculaire de l'ADPR

TABLEAU VII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU POLYADPR PURIFIE

µmoles d'acides aminés/µmoles d'ADPR x 10^2

	après protéolyse		après extraction au phénol		après protéolyse et chromatographie sur DEAE cellulose
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
Ac.aspartique	4,60	6,70	2,69	2,82	1,22
Thréonine	1,35	2,30	1,01	0,79	0,90
Sérine	11,70	21,10	4,65	5,15	3,92
Ac.glutamique	5,95	9,10	3,84	3,59	1,56
Proline	5,80	6,30	2,12	traces	1,62
Alanine	2,40	2,55	1,76	1,24	1,15
Valine	1,32	1,33	1,30	0,57	traces
Isoleucine	0,60	0,97	0,77	0,44	traces
Leucine	1,16	2,19	1,59	1,12	0,38
Tyrosine	0,52	1,45	0,53	0,61	traces
Phénylalanine	0,58	1,09	0,60	0,36	traces
Lysine	4,60	7,03	3,90	3,12	1,15
Histidine	2,34	3,51	1,06	0,94	0,58
Arginine	22,40	26,20	6,70	6,74	2,24
SOMME	65,52	91,82	32,52	27,49	15,17
Glycocolle	66,50	102,00	72,50	75,70	32,44

et rend compte de l'hypochromicité présentée par l'adénine au sein du polymère.

L'atome d'azote excédentaire est à mettre en rapport avec les acides aminés qui restent présents dans nos préparations purifiées de polyADPR. Le tableau VII montre la répartition des acides aminés qui restent liés au poly ADPR après purification, soit par protéolyse ou par extraction au phénol. Les 4 colonnes correspondent à des préparations différentes de polyADPR.

Le taux élevé de glycocolle est à mettre sur le compte d'une hydrolyse de l'adénine. En effet, CAVALIERI, TINKER et BROWN[47] ont signalé que l'action de l'acide chlorhydrique concentré sur les purines (adénine, guanine, xanthine, hypoxanthine et acide urique) provoque la formation de glycocolle, ammoniaque, monoxyde de carbone et dioxyde de carbone.

Dans nos conditions d'hydrolyse (voir sous Matériel et Méthodes) nous avons constaté qu'1 µmole d'ADPR libère environ 0,5 µmole de glycocolle. Ainsi, 50 % au moins du glycocolle est à mettre sur le compte de la dégradation de l'adénine qui peut être plus ou moins poussée comme le suggèrent les variations enregistrées dans le taux de glycocolle particulièrement dans l'expérience 2 après purification du poly ADPR par la méthode faisant appel à une protéolyse.

Ainsi, en tenant compte de l'origine du glycocolle, il apparaît qu'après purification par protéolyse il reste au maximum 1 acide aminé par résidu ADPR, tandis qu'après purification par extraction au phénol il reste encore environ

0,5 acide aminé par résidu ADPR. La longueur des chaînes peptidiques déterminée par mesure de la coloration à la ninhydrine avant et après hydrolyse acide, est inférieure à 18 acides aminés et variable d'une préparation à l'autre sans qu'il soit possible d'établir une relation entre le mode de purification et la longueur des chaînes peptidiques résiduelles. Nous avons essayé un grand nombre de méthodes pour obtenir une meilleure déprotéinisation du polyADPR purifié, soit par protéolyse, soit par extraction au phénol.

Parmi ces essais, citons :

- extractions au phénol : à différents pH, à différentes températures en présence d'hydroxyquinoléine 0,05 %, en présence de diverses concentrations du SDS et de diéthyl-dithiocarbamate (0,05 %).

- extraction par le mélange chloroforme/alcool isoamylique (20 : 1), en présence ou en absence de perchlorate de potassium (1,0 M final).

- extraction en milieu acide : HCl 0,2 N-éthanol 64 %.

- traitement par les enzymes protéolytiques : pronase, papaine, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase, avant ou après traitement par l'acide performique.

- traitement par le Dowex 50 X 4.

- combinaison de ces divers traitements.

Aucun de ces essais n'a permis de réduire notablement le contenu du polyADPR purifié en acides aminés résiduels. Par contre comme le montre le tableau VII, le passage sur DEAE-cellulose paraît introduire une déprotéinisation supplémentaire

ACTION DE LA PHOSPHODIESTERASE -

- PYROPHATATASE (10µg /mL)

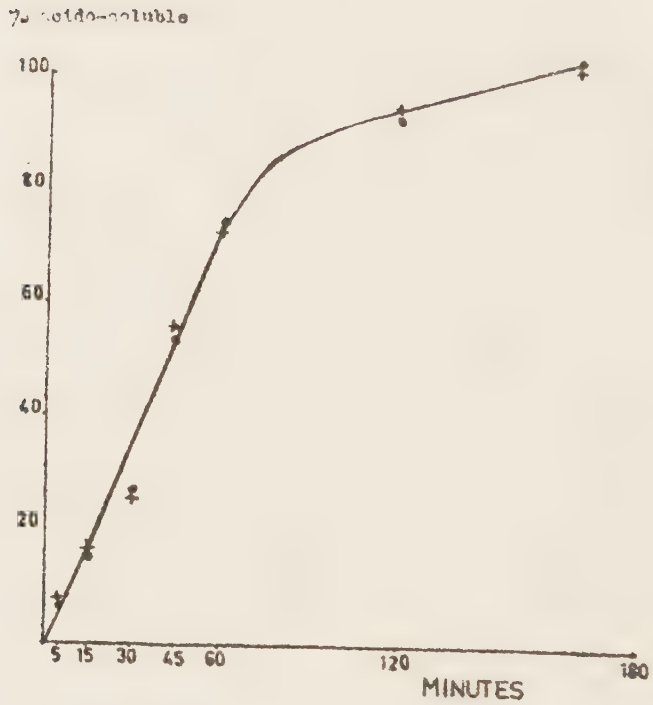


FIGURE 2. - • % de l'absorption ultra-violette rendue acido-soluble.

+ % de la radioactivité rendue acido-soluble

Notons dès maintenant qu'en dehors du glycocolle aucun de ces acides aminés n'est présent après déprotéinisation au phénol à une concentration supérieure à 7 % par rapport à celle de l'ADPR. Après passage sur DEAE-cellulose, ce pourcentage tombe à 2,2 %. Ces constatations excluaient d'emblée que l'acido-insolubilité du produit soit exclusivement due à une liaison entre l'ADPR et des protéines ou peptides eux-mêmes acido-insolubles.

4 - STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR.

Pour faciliter la lecture de notre travail, nous donnons dès maintenant une représentation de la structure du polyADPR. telle que nous la démontrons (Schéma 1bis).

Notre étude a porté sur le polyADPR contenu dans la fraction II (Figure 1) obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose de polyADPR synthétisé *in vitro* et purifié par protéolyse.

4.1 - Hydrolyse du polyADPR par la pyrophosphatase du venin de serpent : obtention du pseudoADPR (ΨADPR).

4.1.1 - Cinétique de l'hydrolyse ménagée.

6 mg de poly [P^{32}] ADPR ont été soumis à une hydrolyse ménagée par la phosphodiestérase-pyrophosphatase de venin de serpent (10 µg/ml, volume final 1,2 ml). Des aliquotes ont été prélevés à différents temps et acidifiés par $HClO_4$ (0,6 N final). Après centrifugation on mesure le surnageant :

a) l'absorption ultraviolette à 2600 Å et à 2800 Å ;

b) la radioactivité devenue acido-soluble.

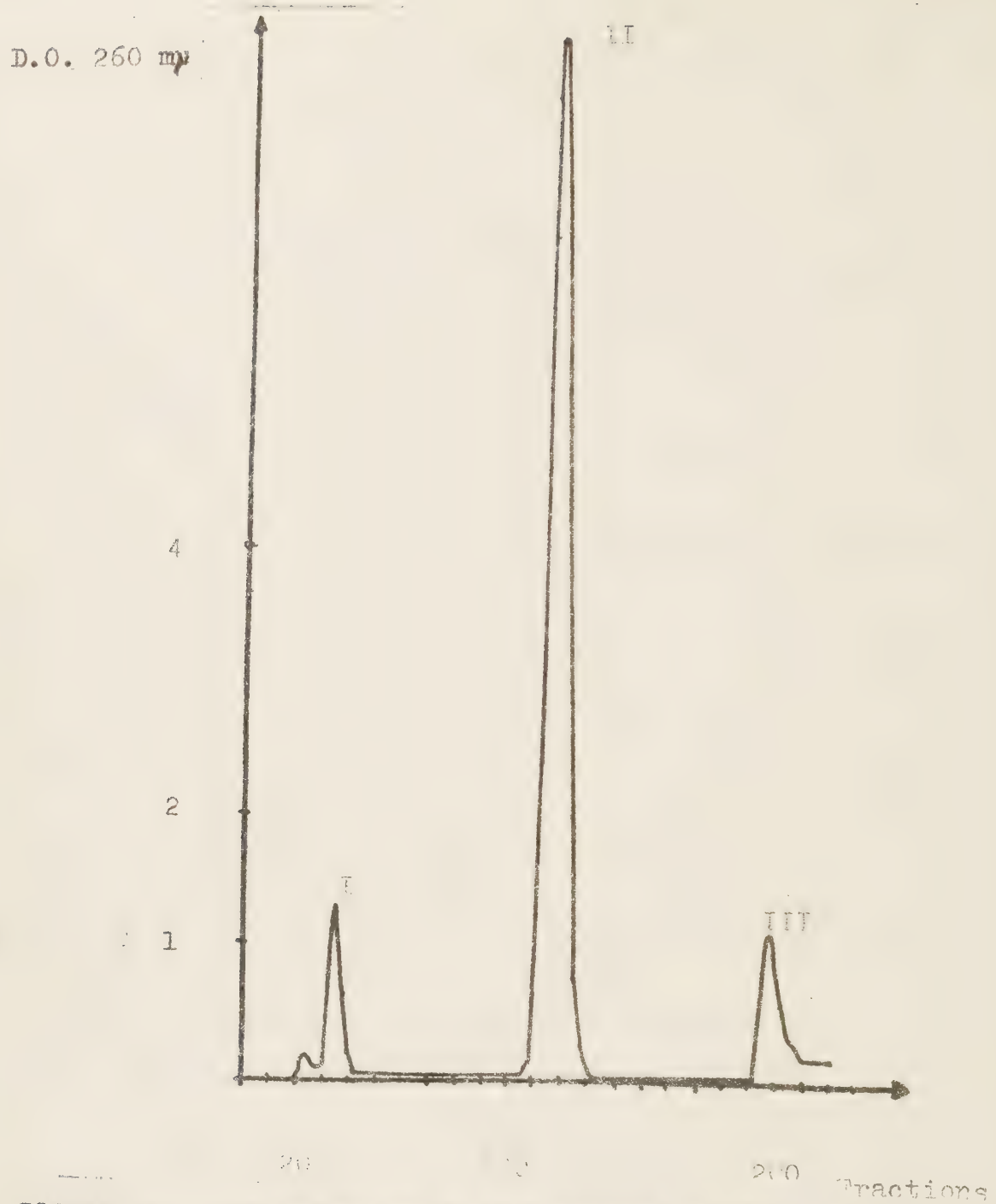


FIGURE 3. - Chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8 sous forme formiate (2,5 x 1,0 cm) d'un hydrolysat pyrophosphatasique de polyADPR. Elution par un gradient exponentiel obtenu avec une chambre de mélange de 540 ml (contenant initialement de l'eau) et un ballon réservoir contenant HCOOH 4N jusqu'au tube 150 puis HCOOH 4 N, formiate, pH 4, HCOO d'ammonium 1 M à partir du tube 151.
Débit : 80 ml/ heure ; volume d'une fraction : 4 ml.

On constate que la radioactivité et l'absorption ultraviolette deviennent progressivement acido-solubles (Figure 2). Des chromatographies sur papier dans le solvant 1 réalisées aux différents temps de l'hydrolyse pyrophosphatasique ménagée, nous montrent l'apparition progressive de taches qui migrent de plus en plus loin du départ alors que le polyADPR initial reste au départ dans les mêmes conditions de chromatographie. Il s'agit des produits d'hydrolyse partielle du polyADPR, comme l'indique leur disparition lorsque l'hydrolyse avance tandis qu'apparaît une tache qui devient de plus en plus importante et qui migre un peu plus loin que l'ADPR dans le solvant utilisé. Lorsque l'hydrolyse est totale cette tache est la seule à subsister avec une tache beaucoup moins importante au niveau du 5'AMP. Nous reviendrons plus loin sur la structure possible des produits d'hyrolyse partielle.

4.1.2 - Analyse de l'hydrolysat obtenu par hydrolyse pyrophosphatasique poussée du polyADPR.

4.1.2.1 - Fractionnement de l'hydrolysat pyrophosphatasique.

Le fractionnement est réalisé par chromatographie sur Dowex 1 X 8 (Figure 3).

Après élution, plus de 96 % du matériel absorbé est récupéré que la mesure soit faite par absorption U.V. ou par la radioactivité. 6,0 % de l'absorption U.V. éluée est présente dans le pic I, 85,5 % dans le pic II et 8,5 % dans le pic III.

TABLEAU VIII

ANALYSE CHIMIQUE DU PSEUDO-ADPR

Substance	µmoles ou µatomes
Phosphore	2,00
Ribose	2,02
Adénine*	1,02
Azote	4,90

* En utilisant un coefficient d'extinction molaire de $14,7 \times 10^3$ à 260 mµ.

Les pics I et II ont été analysés et leur structure a été déterminée. Le pic III disparaît quand l'hydrolyse pyrophosphatasique est prolongée et correspond vraisemblablement au dimère du pic II (voir p.50).

4.1.2.2 - Nature du pic I = 5'AMP.

Il a été identifié par son R_f en chromatographie sur papier (solvants 1 et 2) et sa transformation en phosphate minéral et en adénosine après hydrolyse par la 5'nucléotidase du venin de serpent.

4.1.2.3 - Pic II : pseudoADPR (ΨADPR).

Il s'agit du composé majeur qui apparaît en fin d'hydrolyse pyrophosphatasique ménagée (voir p. 50) comme l'indique son Rf (0,40) intermédiaire entre celui de l'ADPR (0,36) et de l'ADP (0,45), en chromatographie sur papier dans le solvant 1.

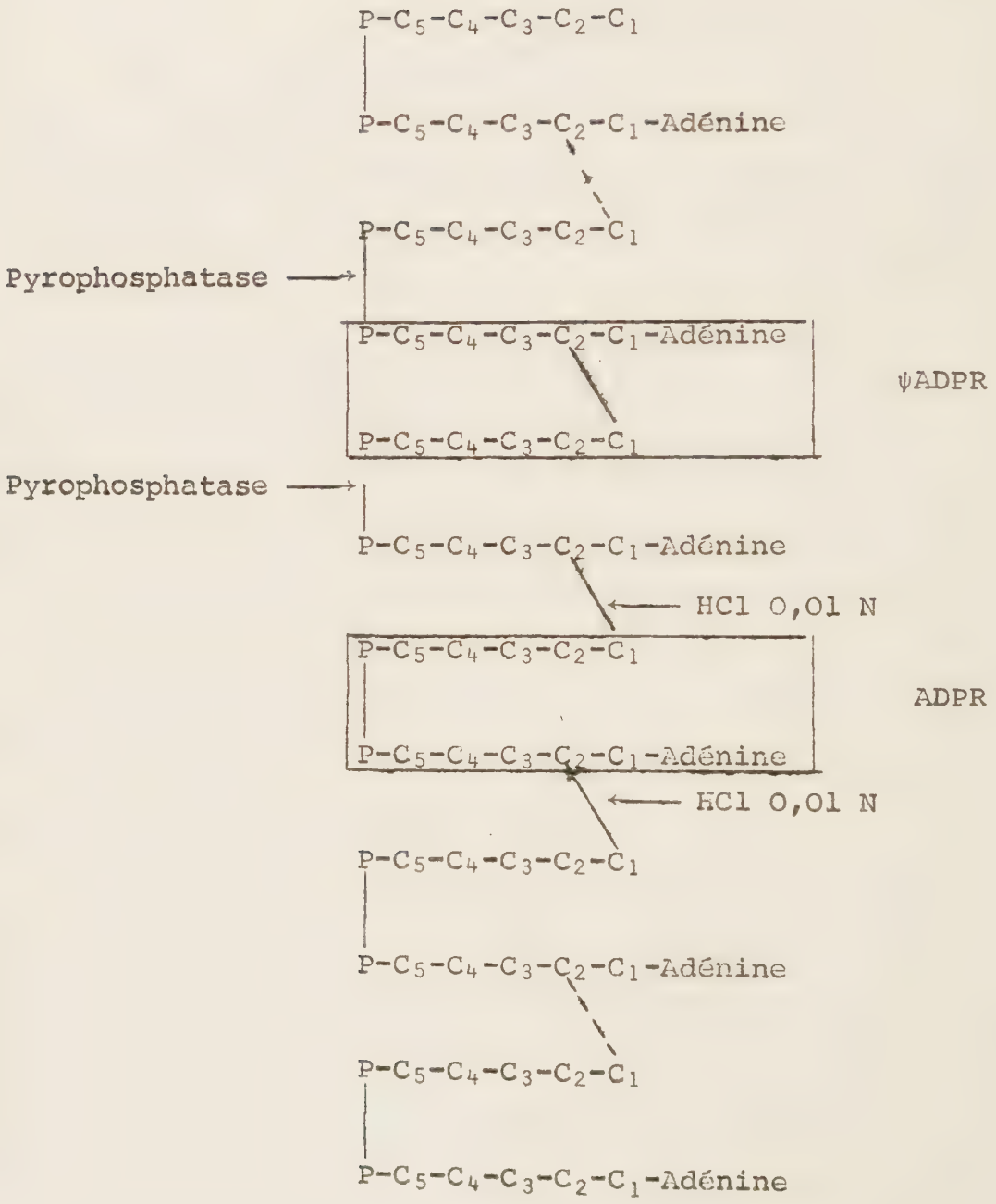
Le pic II est homogène en électrophorèse à haute tension et en chromatographie sur papier dans les solvants 1 et 2.

4.1.2.3.1 - Analyse chimique du pic II.

Elle est résumée dans le tableau VIII. Ce composé a une composition analogue à celle de l'ADPR, 2 atomes de phosphore pour 2 molécules de ribose et 1 molécule d'adénine. Il est intéressant de remarquer d'une part la disparition de l'effet hypochromique après hydrolyse du poly ADPR et d'autre part la concordance entre le nombre d'atomes d'azote et le contenu en azote de l'adénine. Ainsi les acides aminés ne restent pas attachés à l'ADPR après hydrolyse pyrophosphatasique, ce qui est un argument supplémentaire pour écarter l'éventualité

SCHEMA

Structure primaire du polyADPR



d'un rôle prépondérant de liaisons covalentielles entre l'ADPR et des peptides dans le mécanisme rendant l'ADPR acido-insoluble. Toutefois le composé du pic II diffère de l'ADPR authentique par un certain nombre de propriétés et nous l'avons appelé "ΨADPR".

- il n'est pas hydrolysable par la pysophosphatase du venin de serpent.

- il ne possède pas de pouvoir réducteur contrairement à l'ADPR. Toutefois, après hydrolyse en milieu HCl 0,01 N à 100 ° pendant 45 min, un équivalent ADPR de pouvoir réducteur apparaît.

- il ne consomme qu'une molécule de métapériodate par molécule d'adénine alors que l'ADPR authentique en consomme 3. Toutefois après hydrolyse acide, la consommation de métapériodate s'élève à 3 molécules par mole d'adénine.

- l'hydrolyse par la phosphatase alcaline libère deux phosphates par molécule sans provoquer l'apparition du pouvoir réducteur ni l'augmentation de la consommation de métapériodate.

L'ensemble de ces données suggère qu'il existe dans le Ψ ADPR une liaison entre le C_1 du ribose, qui était lié à la nicotinamide dans le DPN, et le C_2, ou le C_3 du ribose de la fraction adénylique.

Dans cette hypothèse, l'hydrolyse acide douce en milieu HCl 0,01 N devrait libérer du 5'AMP et R_5P et l'action d'une phosphatase alcaline devrait livrer un ribosyladénosine.

TABLEAU IX

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DU 5'AMP PROVENANT DE L'HYDROLYSE ACIDE MENAGEE DU ΨADPR

Substance	µmoles ou µatomes
Phosphore	1,00
Ribose	1,06
Adénine	1,05
Consommation d'IO_4K / µmole de ribose	1,02

TABLEAU X

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DU RIBOSE-5-PHOSPHATE PROVENANT DE L'HYDROLYSE ACIDE MENAGEE DU ΨADPR

Substance	µmoles ou µatomes
Ribose	1,09
Phosphore	1,00
Pouvoir réducteur*	0,95/mole
Consommation d'IO_4K / µmole de ribose	1,97

*exprimé en équivalent de ribose par molécule de R_5P.

4.1.2.3.2.- Produits de l'hydrolyse acide ménagée du pseudoADPR.

Les produits d'hydrolyse acide douce du ΨADPR (HCl 0,01 N, 45 min. à 100°), sont fractionnés sur colonne de Dowex 1 X 8 (Figure 4).

4.1.2.3.2.1 - Fraction I = adénine.

L'identité de cette fraction est prouvée par son spectre et sa migration sur papier dans le solvant 1. Il s'agit d'un produit d'hydrolyse du pic II car il est très difficile d'obtenir une hydrolyse totale de l'ADPR en 5'AMP et R_5P sans en même temps hydrolyser partiellement le 5'AMP en adénine et R_5P.

4.1.2.3.2.2 - Fraction II = 5'AMP.

L'identité de cette fraction est prouvée par l'analyse (Tableau IX) et par l'hydrolyse avec la 5'nucléotidase de venin de serpent qui livre exclusivement du phosphate et de l'adénosine identifiée par chromatographie sur papier dans le solvant 1.

4.1.2.3.2.3 - Fraction III = R_5P.

Cette fraction contient un constituant mineur absorbant dans l'U.V. correspondant à l'ADPR qui n'a pas été complètement hydrolysé, cette hydrolyse était volontairement limitée pour éviter une dégradation trop importante du 5'AMP.

Le constituant majeur de cette fraction a été identifié au ribose-5-phosphate par l'ensemble de ses propriétés analytiques (Tableau X) et par la cinétique de la réaction de Mejbaum qui, selon GREGOIRE[49], permet de différencier le

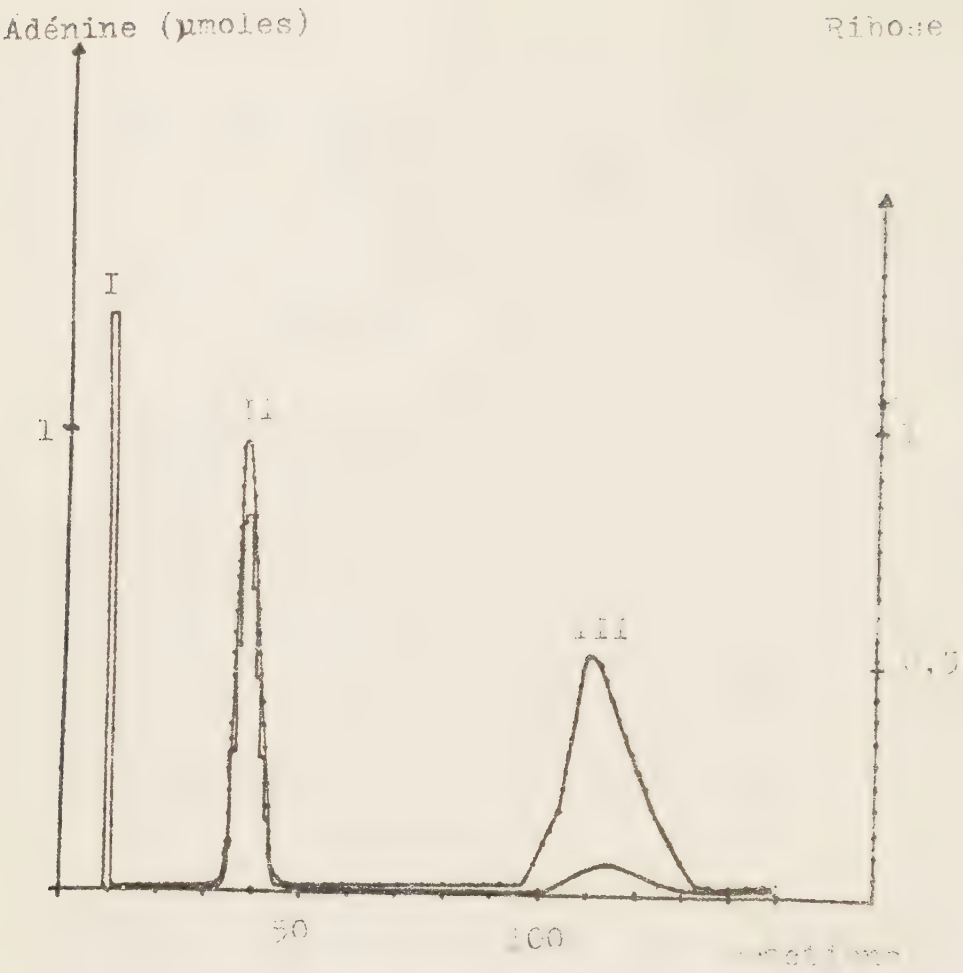


FIGURE 4. - Chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8 sous forme formiate (25 x 1 cm) de l'hydrolyset acide du YADPR. Elution par un gradient exponentiel obtenu avec une chambre de mélange de 540 ml (contenant initialement de l'eau) et un ballon réservoir contenant HCOOH 4 N. Débit : 80 ml/heure; volume d'une fraction : 4 ml.

———— µmoles d'adénine.

—•—•—•— µmoles de ribose.

ribose-5-phosphate du ribose-2-phosphate ou du ribose-3-phosphate (Figure 5).

4.1.2.3.3.- Hydrolyse phosphatasique du ΨADPR= obtention de ribosyladénosine.

38,0 µmoles de ΨADPR sont hydrolysées par 500 µg/ml de phosphatase alcaline intestinale (volume final 10 ml) à 37°.

Après avoir vérifié, par dosage direct du phosphate que tous les phosphates du ΨADPR sont libérés, nous passons l'hydrolysat sur colonne de Dowex 1 X 8. Tout le matériel absorbant dans l'U.V. est élué avec de l'eau distillée.

La chromatographie de ce matériel dans différents solvants, ne montre qu'une seule tache migrant au niveau de l'adénosine dans le solvant 1. Les caractéristiques analytiques de ce composé sont résumées dans le tableau XI.

TABLEAU XI

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DU RIBOSYLADENOSINE ISOLE APRES ACTION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE SUR LE ΨADPR

Substance	µmoles
Adénine	1,00
Ribose	1,85
Pouvoir réducteur*	0
Pouvoir réducteur après hydrolyse HCl 0,01 N 30 min. à 100°	0,90
Consommation d'IO_4K/µmole d'adénine	1,00
Consommation d'IO_4K/µmole d'adénine après hydrolyse HCl 0,01 N 30 min. à 100°	2,90

* exprimé en équivalent de ribose par µmole.

CINETIQUE DE LA REACTION DE MEJBAUM

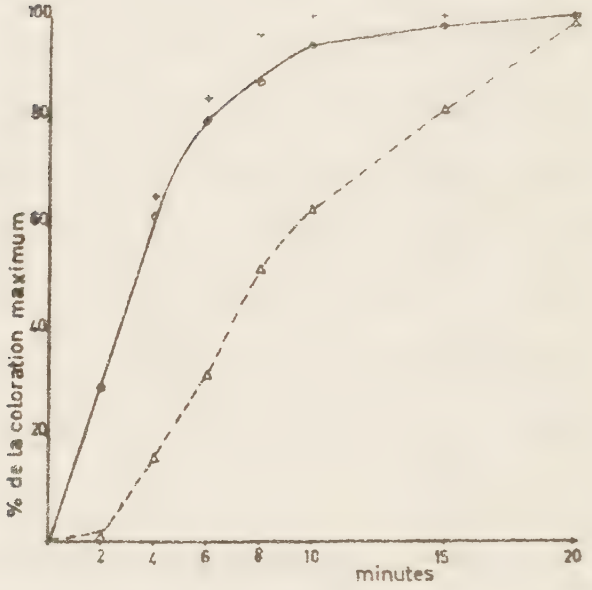


FIGURE 5. -Δ- 2'-3'AMP.
-○- Ribose-5-phosphate.
+ Ribose-phosphate provenant de l'hydrolyse acide du ΨADPR.

L'ensemble des résultats des hydrolyses acide douce et phosphatasique, confirme donc notre hypothèse à savoir que le ΨADPR serait formé de 2 fractions, ribose-5-phosphate et 5'AMP, liées par une liaison osidique. Le schéma 2 présente deux structures possibles du ΨADPR qui rendent compte de l'ensemble de nos observations (Schéma 2).

Théoriquement deux possibilités existaient pour la liaison osidique : elle pouvait s'établir entre les C'_2 ou C'_3 du 5'AMP et le C'_1 porteur de la fonction semi-acétalique du ribose-5-phosphate.

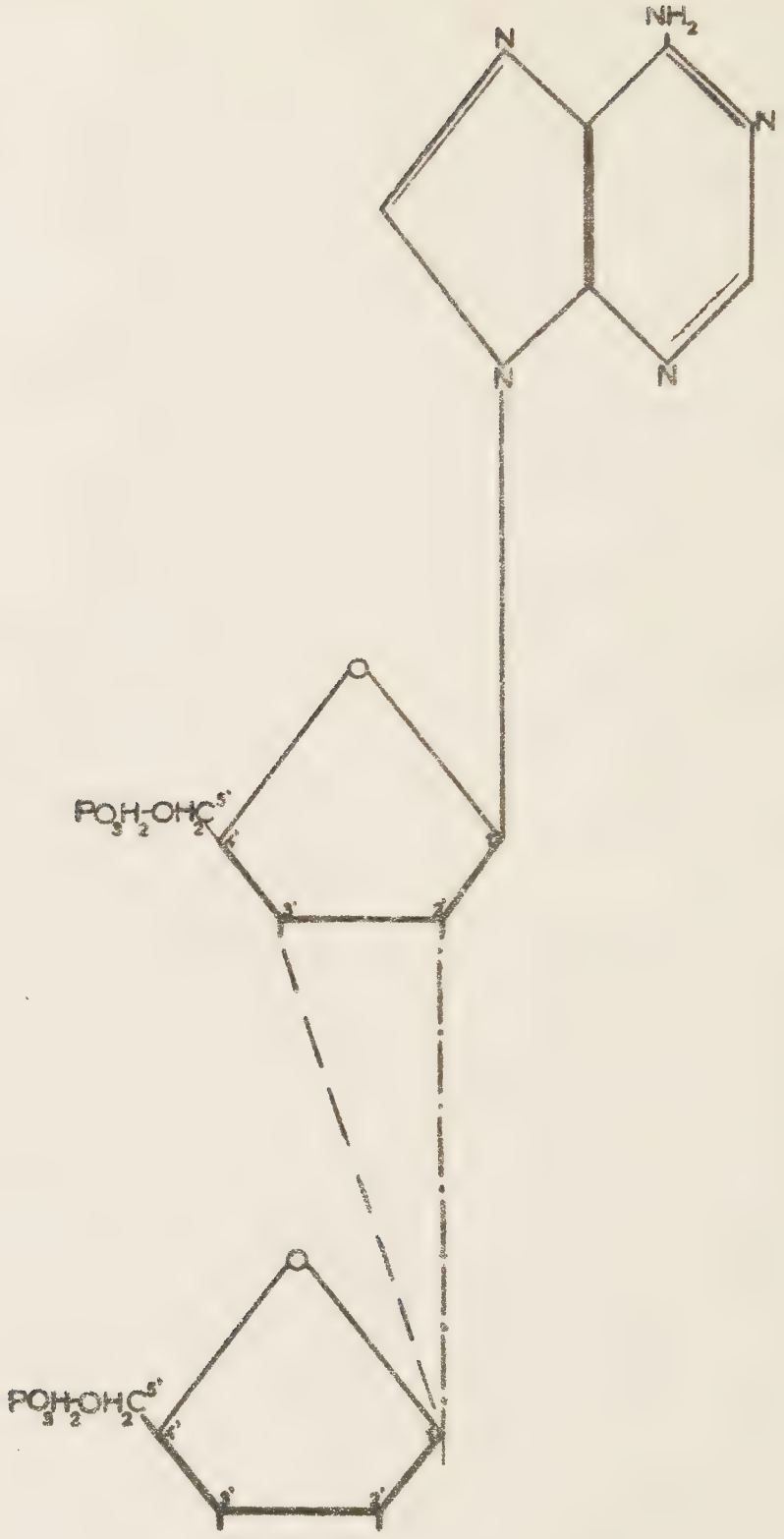
Nous avons entrepris des expériences de méthylation du ribosyladénosine pour résoudre ce point.

4.1.2.3.4 - Résultats de la méthylation du ribosyladénosine.

Compte-tenu de la structure proposée pour le ADPR, le ribosyladénosine peut être représenté par les formules du schéma 3.

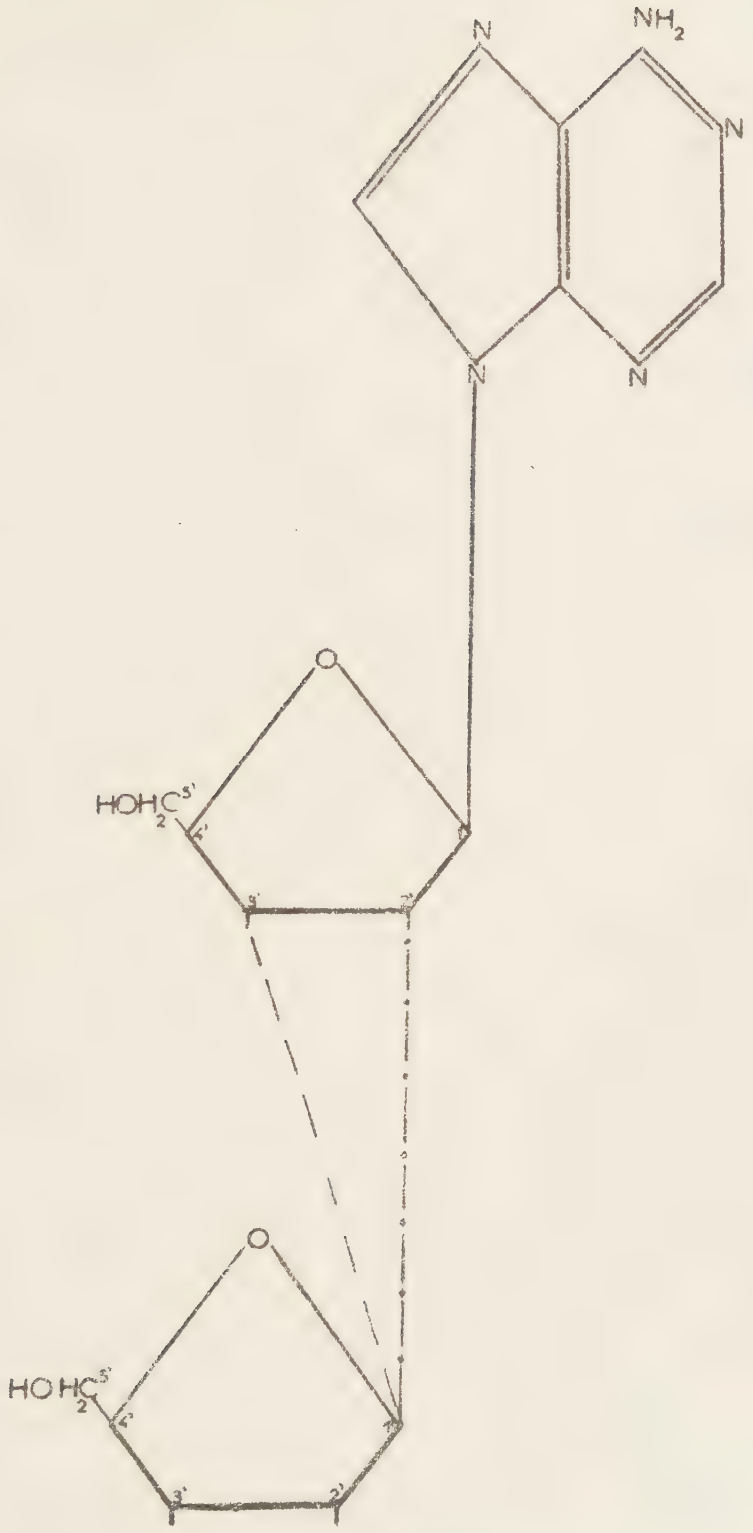
Si la fonction alcool secondaire portée par le carbone 2 de l'adénosine est engagée dans le pont osidique, nous devrions pouvoir méthyler les fonctions alcools portées par les carbones 3' et 5' de l'adénosine, et après hydrolyse acide on devrait obtenir du N_{10} méthyladénine, du 3-5 diméthylribose et du 2-3-5-triméthylribose.

Par contre, si la fonction alcool secondaire portée par le carbone 2' est libre et la fonction alcool secondaire portée par le carbone 3', engagée dans la liaison osidique, ce sont les carbones 2' et 5' de l'adénosine qui seront



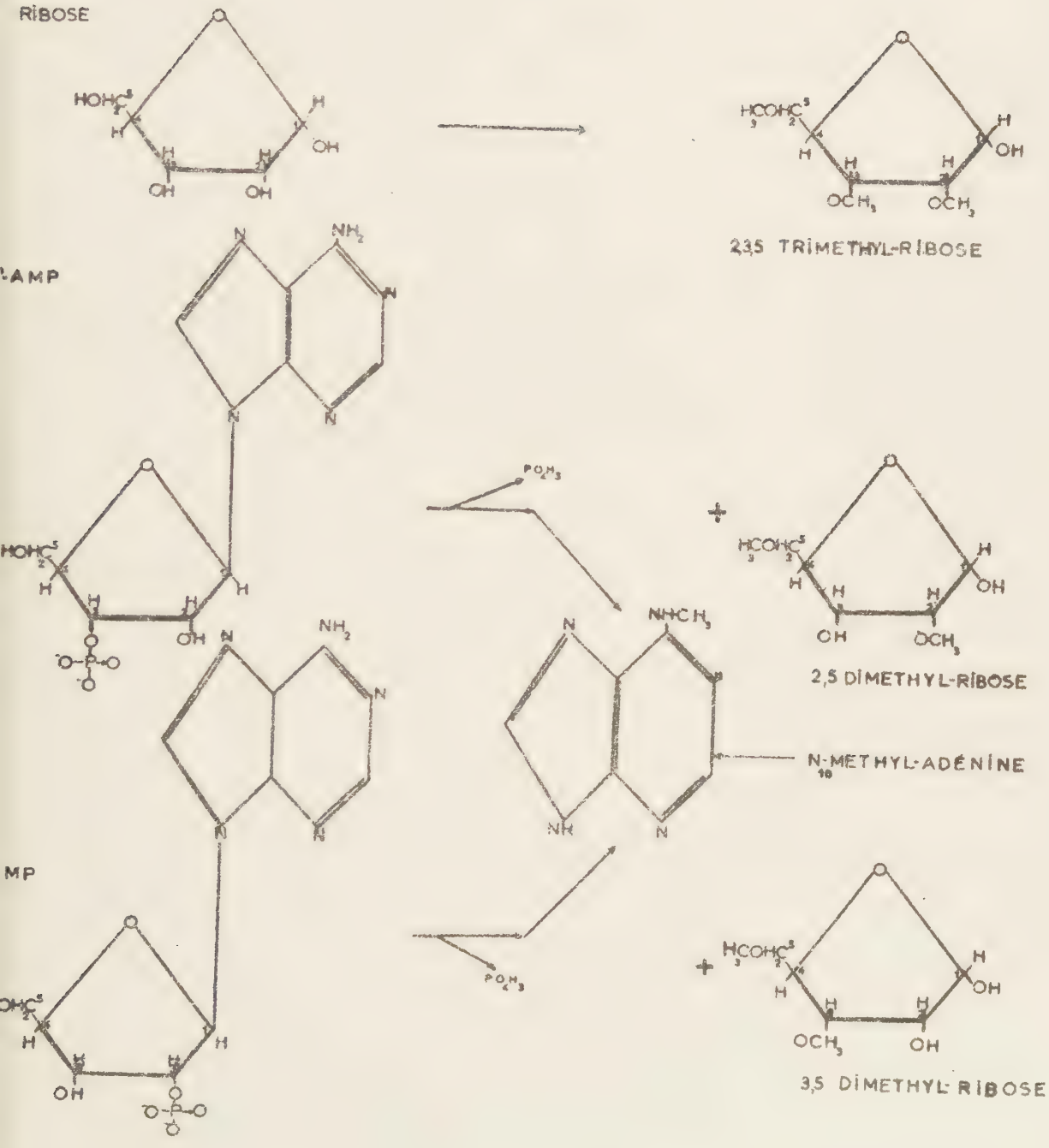
STRUCTURES POSSIBLES DU ΨADPR

Schéma 3



STRUCTURES POSSIBLES DU RIBOSYLADÉNOSINE

Schéma 4


RIBOSE
2,3,5 TRIMETHYL-RIBOSE
AMP
2,5 DIMETHYL-RIBOSE
N-METHYL-ADENINE
MP
3,5 DIMETHYL-RIBOSE

méthylés et après hydrolyse nous obtiendrions du 2-5 diméthylribose à côté de N_{10} méthyladénine et de 2-3-5 triméthylribose. Afin de disposer de dérivés méthylés de référence nous avons synthétisé : le 2-3-5-triméthylribose à partir du ribose, le 2-5-diméthylribose à partir du 3'AMP, le 3-5 diméthylribose à partir du 2'AMP (Schéma 4).

La technique de méthylation et les divers solvants de chromatographie que nous avons mis au point pour séparer les différents dérivés méthylés du ribose ont été décrits sous "Matériel et Méthodes".

Nos résultats sont illustrés par des photographies des taches observées en chromatographie dans différents systèmes des dérivés obtenus après méthylation et hydrolyse acide du ribosyladénosine.

La figure 6 indique qu'en chromatographie ascendante monodimensionnelle l'hydrolysat acide du ribosyladénosine méthylé contient du 3-5-diméthylribose, du 2-3-5-triméthylribose et du N_{10} méthyladénine.

Afin d'être certain que le seul sucre diméthylé présent était du 3-5-diméthylribose nous avons procédé à une chromatographie bidimensionnelle en ajoutant du 3-5-diméthylribose authentique à l'hydrolysat acide du ribosyladénosine méthylé.

Dans ce système de solvants utilisé, le 2-3-5-triméthylribose et le N_{10} méthyladénine migrent en dehors du film Kodak et on ne révèle qu'une tache, ce qui indique que seul le 3-5-diméthylribose est présent (Figure 7).

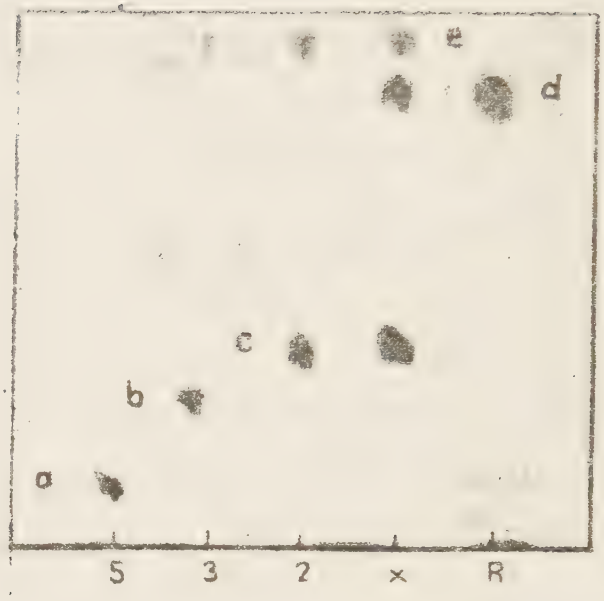


FIGURE 6. - Chromatographie ascendante monodimensionnelle sur film Kodak 301 V. Les solvants 6 et 7 ont été utilisés successivement.

tache a = 2.3-diméthylribose provenant du ribose-5-phosphate.

tache b = 2.5-diméthylribose provenant du 3'AMP.

tache c = 3.5-diméthylribose provenant du 2'AMP.

tache d = 2.3.5-triméthylribose provenant du D-ribose.

tache e = N_{10}-méthyladénine

tache x = hydrolysat acide du ribosyladénosine méthylé.

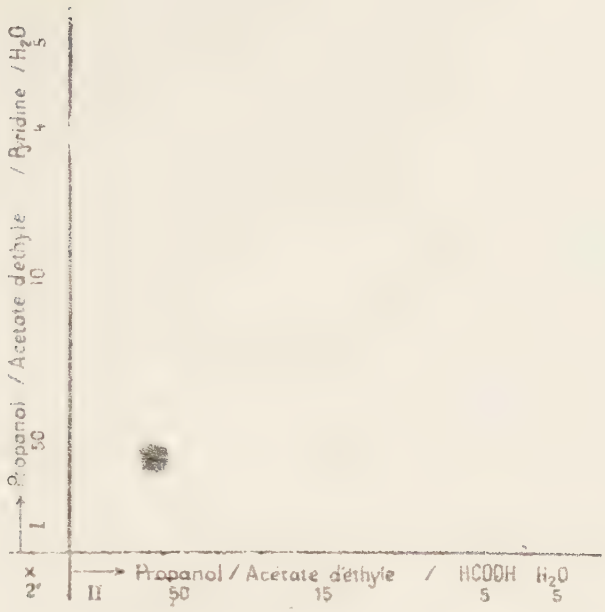


FIGURE 7. - Chromatographie bidimensionnelle sur film Kodak 301V
Tache de départ : diméthylribose provenant du ribosyladénosine méthylé + 3.5-diméthylribose provenant du 2'AMP méthylé.

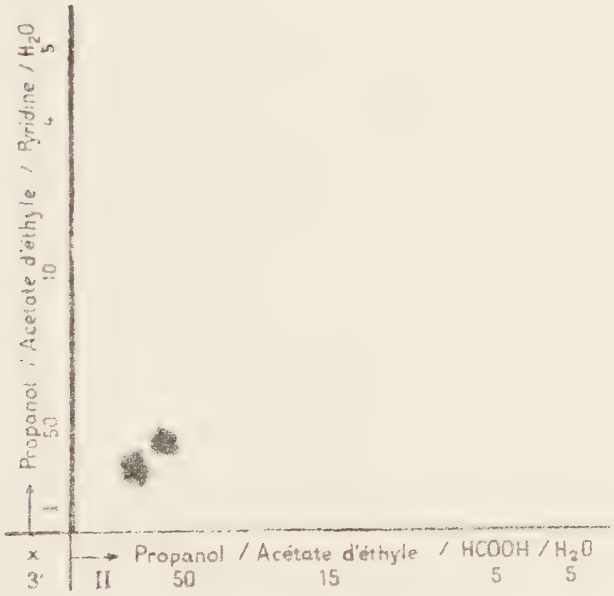
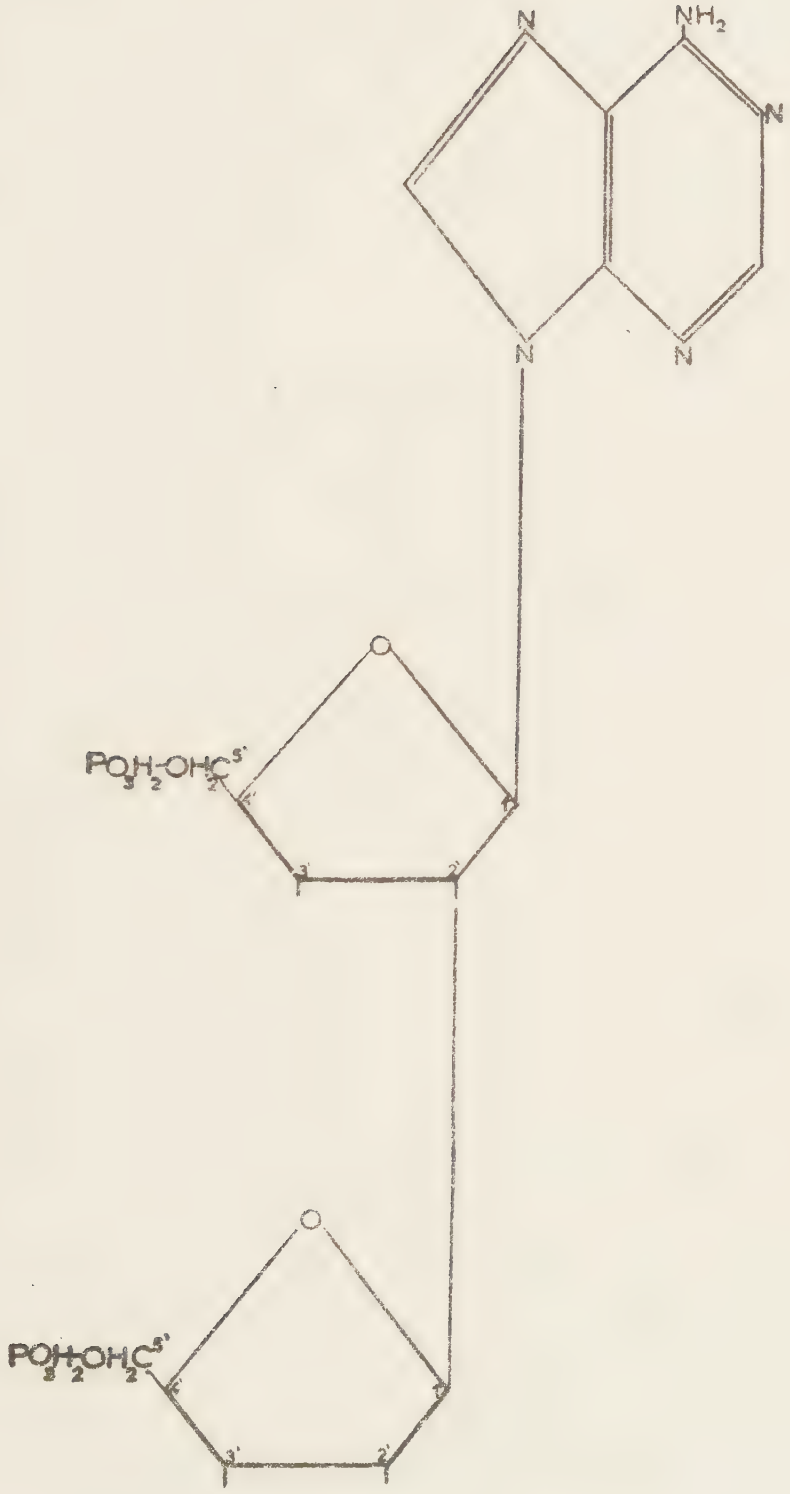


FIGURE 8. - Chromatographie bidimensionnelle sur film Kodak 301V
Tache de départ : diméthylribose provenant du ribosyladénosine méthylé + 2.5-diméthylribose provenant du 3'AMP méthylé.

Schéma 5



ΨADPR = D-RIBOFURANOSYL-5'PHOSPHATE

(1'→2') ADÉNOSINE-5'-PHOSPHATE

Au contraire, (Figure 8) lorsque dans les mêmes conditions l'on ajoute du 2-5-diméthylribose authentique à l'hydrolysat acide du ribosyladénosine méthylé, on obtient 2 taches : l'une (la plus proche du point de départ) correspondant au 2-5-diméthylribose ajouté, l'autre au 3-5-diméthylribose provenant de l'hydrolyse acide du ribosyladénosine méthylé.

Il apparaît donc qu'après méthylation le diméthylribose provenant de l'adénosine est exclusivement du 3-5-diméthylribose. Dans nos conditions expérimentales, la présence de 10 % de 2-5-diméthylribose aurait pu être facilement mise en évidence.

4.1.2.3.5 - Formules de ribosyladénosine et du ΨADPR.

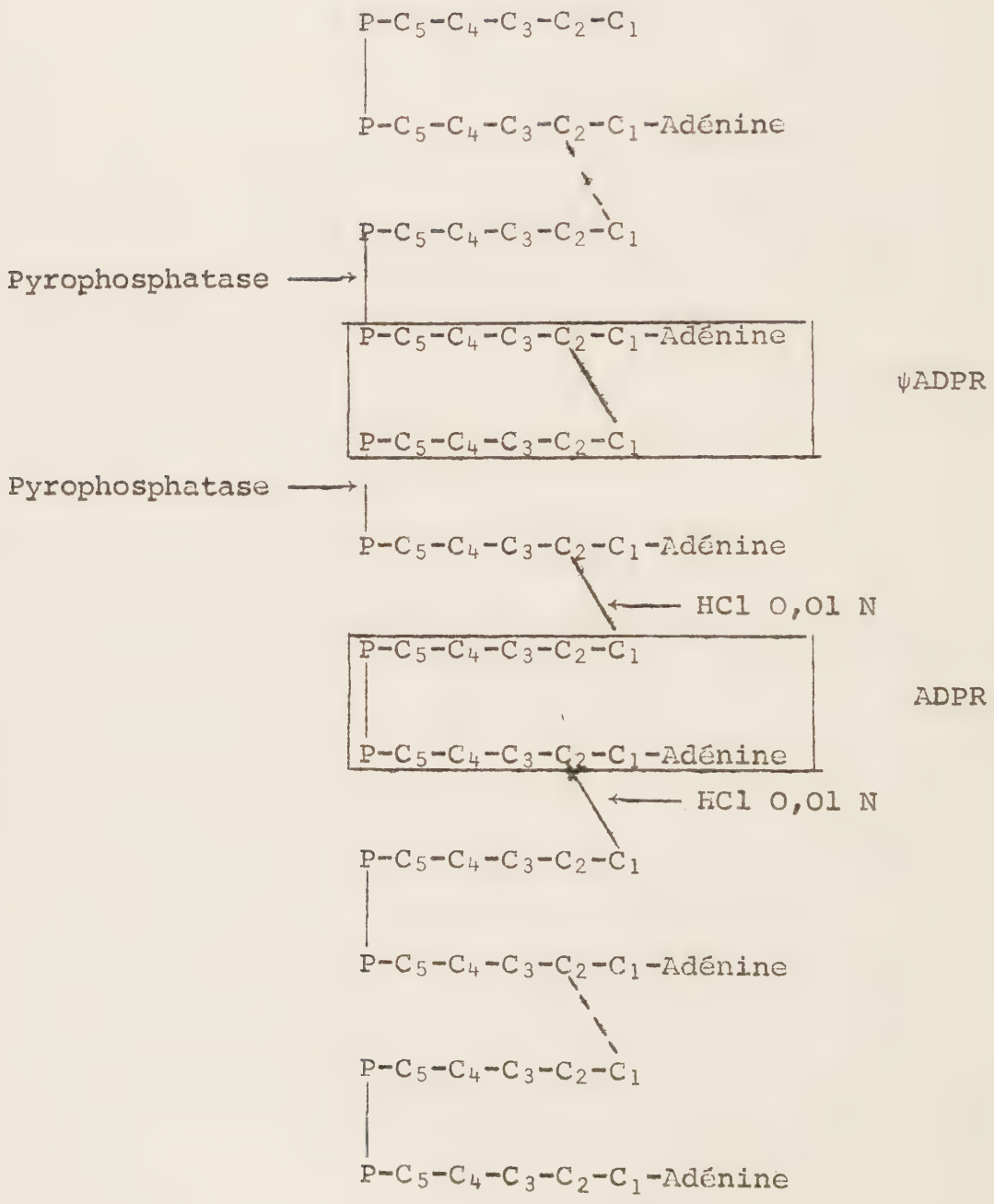
Nos résultats démontrent que dans le ribosyladénosine, le ribose est exclusivement lié à l'adénosine par une liaison osidique de type ($C_{1'} \longrightarrow C_{2'}$). La nature de cette liaison reste pourtant inconnue. Toutefois, la liaison dans le DPN étant du type β, nous supposerons qu'il en est de même dans le ΨADPR et avec cette réserve il est possible d'assigner au ribosyladénosine la structure d'un β-D-ribofuranosyl (1' - 2') adénosine et au ΨADPR d'un β-D-ribofuranosyl-5'-phosphate (1' - 2') adénosine 5'-phosphate (ou 5'-phospho-β- D-ribofuranosyl (1'-2') 5'-phospho-β-D-ribofuranosyl-adénine) (Schéma 5).

4.2 - Structure primaire du polyADP ribose.

Le pseudo ADPR étant le produit de l'hydrolyse pyrophosphatasique du polyADPR, on peut par conséquent proposer pour

SCHEMA

Structure primaire du polyADPR



celui-ci la structure primaire représentée dans le schéma 6.

4.3 - Confirmation de la structure du polyADPR par les réactions de l'hydrolyse acide.

Si la structure proposée est exacte et étant donné la labilité de la liaison osidique en milieu acide dilué, l'hydrolyse acide du polyADPR doit livrer essentiellement de l'ADPR (schéma 6).

Toutefois, étant donné la labilité de la liaison pyrophosphatasique et celle de la liaison ribofuranoside de l'adénosine, il faut s'attendre à trouver aussi du 5'AMP et de l'adénine parmi les produits d'hydrolyse.

4.3.1 - Fractionnement des composés obtenus après hydrolyse acide (HCl 0,01 N) du polyADPR.

40 mg de polyADPR sont hydrolysés dans HCl 0,01 N. Une hydrolyse de 45 min. à 100° est nécessaire pour rendre acido-soluble la totalité du polyADPR ; après neutralisation et dilution, l'hydrolysat est adsorbé sur Dowex 1 X 8. Environ 25 % du matériel absorbant dans l'ultra-violet est élué par lavage avec de l'eau et correspond à de l'adénine. L'élution par un gradient d'acide formique livre deux fractions (Figure 9), l'une, fraction I qui est mineure, correspond à du 5'AMP, tandis que la fraction II correspond à 70 % du matériel absorbant dans l'ultra-violet adsorbé initialement sur la résine. Cette fraction est homogène en chromatographie sur papier dans les solvants 1 et 2 et migre comme l'ADPR authentique.

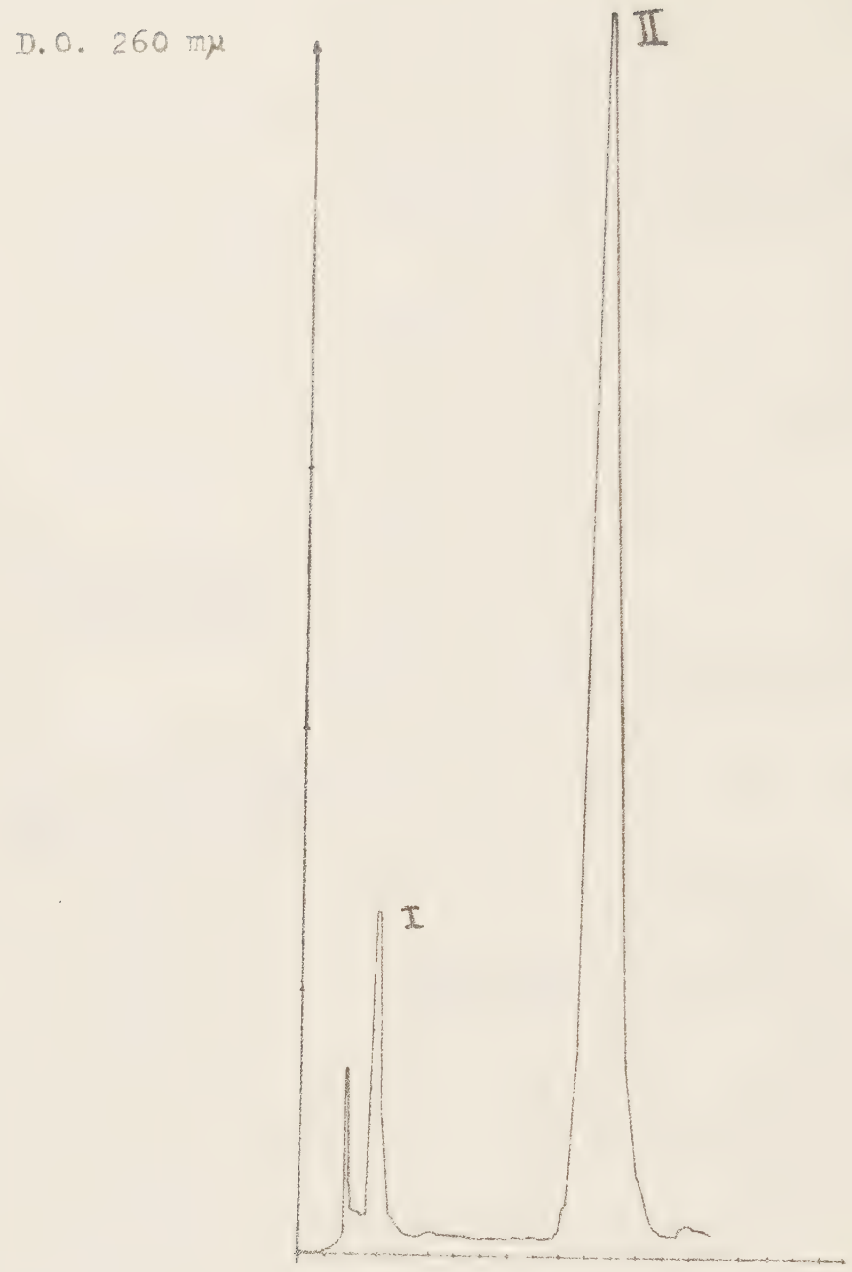


FIGURE 2. - Chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8 sous forme formiate (25 x 1 cm) d'un hydrolysat acide (HCl 0,02 N) de poly-ADPR. Elution par un gradient exponentiel obtenu avec une chambre de mélange de 540 ml (contenant initialement de l'eau) et un ballon réservoir, contenant HCOOH 4 N jusqu'au tube 129, puis HCOOH 4 N formiate d'ammonium M à partir du tube 130.
Débit : 80 ml/heure ; volume d'une fraction : 4 ml.

4.3.2 - Identification de la fraction II : ADPR.

Il s'agit effectivement d'ADPR comme en témoignent ses caractéristiques analytiques qui sont résumées dans le tableau XII et qui sont celles de l'ADPR authentique.

TABLEAU XII

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DE L'ADPR ISOLE PAR HYDROLYSE ACIDE DU POLYADPR

Substance	µmoles ou µatomes
Phosphore	2,00
Ribose	2,14
Adénine	1,00*
Pouvoir réducteur	0,98**
Consommation d'IO_4K / µmole d'adénine	2,90

* coefficient d'extinction molaire $14,7 \times 10^3$

** exprimé en équivalent de ribose/molécule d'ADPR

D'autre part l'hydrolyse pyrophosphatasique de ce composé le transforme quantitativement en ribose-5-phosphate et en 5'AMP qui ont été identifiés par chromatographie sur papier.

Les résultats obtenus par hydrolyse acide en milieu HCl 0,01 N confirment donc le schéma proposé pour la structure du polyADPR : les monomères ADPR sont essentiellement

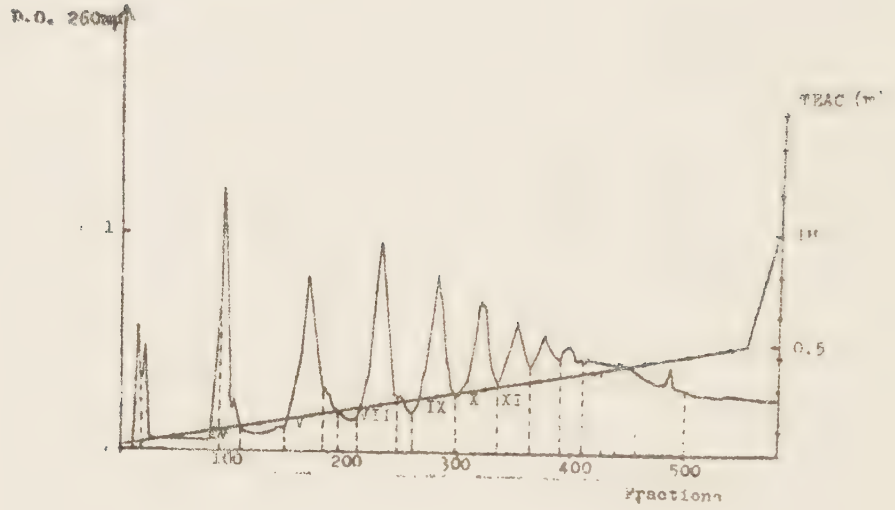


FIGURE 10. - Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (45 x 1,2 cm) de polyADPR après hydrolyse acide ménagée. Elution par un gradient linéaire de carbonate de triéthylamine (TEAC) pH 8,6 , urée 7 M, 1 litre TEAC 0,01 M, urée 7 M + 1 litre TEAC 0,6 M, urée 7 M jusqu'au tube 550, puis TEAC 1 M, urée 7 M. Débit : 36 ml/heure ; volume d'une fraction : 3 ml.

polymérisées par établissement de liaison osidique entre le C'_1 porteur d'une fonction semi-acétalique d'une molécule d'ADPR et le C'2 porteur d'une fonction alcool secondaire de la fraction adénylique de la molécule d'ADPR adjacente.

Nous avions déjà noté plus haut que l'hydrolyse pyrophosphatasique ménagée du polyADPR livrait en chromatographie sur papier, une série de taches migrant de plus en plus loin du départ au fur et à mesure que l'hydrolyse progressait. Cette observation suggérait la possibilité d'isoler des oligomères de l'ADPR après hydrolyse partielle du polyADPR.

4.4 - Mise en évidence d'oligomères de l'ADPR après hydrolyse limitée du polyADPR.

4.4.1 - Hydrolyse acide partielle du polyADPR.

31 µmoles (en équivalent ADPR) du polyADPR provenant de la fraction II de la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose de polyADPR(Figure 1) sont soumises à une hydrolyse acide partielle (pH 2,5) pendant 1 heure à 100°. Après neutralisation l'hydrolysat est chromatographié sur colonne de DEAE cellulose en présence d'urée 7 M. La figure 10 représente le profil d'élution obtenu. La succession des pics suggère fortement qu'il pourrait s'agir d'ADPR et d'oligomères d'ADPR, dimères, trimères, tetramères, etc.

Théoriquement et étant donné la structure proposée pour le polyADPR il devrait être possible d'identifier ces divers pics en les hydrolysant avec la pyrophosphatase de venin de serpent et en mesurant le rapport ψADPR/5'AMP ou le rapport ψADPR/R_5P dans les produits d'hydrolyse. En effet, un dimère

d'ADPR devrait, après hydrolyse pyrophosphatasique, livrer une molécule de ΨADPR, une molécule de 5'AMP et une molécule de R_5P, tandis que le trimère livrerait ces substances dans le rapport 2/1/1, le tétramère dans le rapport 3/1/1 etc. Le dosage de l'AMP étant beaucoup plus aisé que celui du R_5P, nous avons étudié le rapport ΨADPR/5'AMP dans les produits d'hydrolyse.

Après lyophilisation et élimination de l'urée et du carbonate de triéthylamine, les pics IV, V, VII, IX et X sont chromatographiés dans le solvant 1. Leur R_f est, dans l'ordre, de plus en plus faible et le pic IV est sensiblement au niveau de l'ADPR marqueur.

Après hydrolyse à la pyrophosphatase de venin de serpent, le pic IV est quantitativement transformé en 5'AMP, tandis que les pics V, VII, IX et X donnent des taches migrant au niveau du ΨADPR et du 5'AMP.

TABLEAU XIII

COMPOSITION DES HYDROLYSATS PYROPHOSPHATASIQUES DES PICS V, VII, IX et X OBTENUS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE DE POLYADPR PARTIELLEMENT HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE

(Les valeurs correspondant à l'absorption à 260 mμ exprimée en unités de denisté optique)

		Pic V	Pic VII	Pic IX	Pic X
Absorption à 260 mμ	ΨADPR	0,44	0,92	1,00	0,82
	5'AMP	0,58	0,46	0,40	0,22
	$\frac{\Psi ADPR}{5'AMP}$	0,76	2,00	2,50	3,73

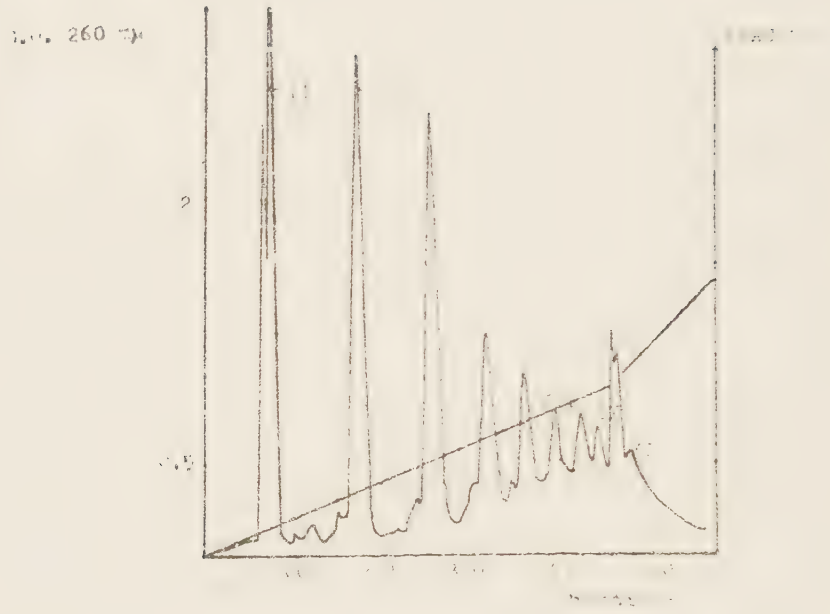


FIGURE 11. - Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (45 x 1,2 cm) de polyADPR après hydrolyse pyrophosphatasique ménagée. Elution par un gradient linéaire de carbonate de triéthylamine (TEAC) pH 8,6, urée 7 M : 1 litre TEAC 0,01 M, urée 7 M + 1 litre TEAC 0,6 M, urée 7 M jusqu'au tube 430 ; au tube 440 élution avec le gradient suivant : 500 ml de TEAC 0,6 M, urée 7 M , 500 ml TEAC 1 M, urée 7 M jusqu'au tube 560 où le gradient est remplacé par 250 ml de TEAC. M urée 7 M. Débit : 36 ml/ heure ; volume d'une fraction : 3 ml.

L'absorption dans l'U.V. des différentes taches après élution est mesurée à 260 mμ. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIII. En tenant compte des erreurs expérimentales inhérentes à ce genre de manipulations lorsque l'on travaille avec de petites quantités de matériel, on peut raisonnablement conclure que les pics V, VII, IX et X correspondent respectivement au dimère, trimère, tetramère et pentamère d'ADPR. La quantité de matériel présent dans les pics suivants (XI, XII, etc) n'est pas suffisante pour obtenir une détermination correcte du rapport ADPR/5'AMP après hydrolyse pyrophosphatasique, mais il y a tout lieu de penser qu'il s'agit des homologues supérieurs.

4.4.2 - Hydrolyse pyrophosphatasique partielle du polyADPR.

Si la structure proposée pour l'enchaînement des molécules d'ADPR dans le polyADPR est exacte (schéma 6) une hydrolyse partielle par la pyrophosphatase devrait logiquement livrer des oligomères du ΨADPR dans lesquels les molécules de ΨADPR seraient polymérisées par l'intermédiaire de liaisons pyrophosphates.

La figure 11 montre le profil d'élution obtenu après chromatographie sur colonne de DEAE cellulose en présence d'urée 7 M d'un hydrolysat pyrophosphatasique de polyADPR (72 μmoles en équivalent ADPR hydrolysées pendant 2 h à 37° en présence de 150 μg de pyrophosphatase de venin de serpent, volume final 8,0 ml). On voit une succession de pics

qui, après lyophilisation, ont été chromatographiés sur papier dans le solvant 1. Le pic II a été identifié au 5'AMP et le pic III au ΨADPR. Les pics suivants sont probablement les dimères, trimères, tetramères etc., du ΨADPR. Les pics IV, V, VI, VII ont des R_f régulièrement décroissants dans le solvant utilisé et à partir du pic VIII le matériel adsorbant dans l'U.V. ne migre plus. Malheureusement dans le cas présent nous ne disposons pas de méthodes qui permettent de démontrer aisément qu'il s'agit effectivement de dimères, trimères, etc. puisque l'hydrolyse acide douce (HCl 0,01 N, 45 min. à 100°) qui, théoriquement, devrait livrer de l'ADPR d'une part, du 5'AMP et du ribose-5-phosphate d'autre part, dans les rapports 1/1, 2/1, 3/1 etc., peut provoquer également une rupture de certaines liaisons pyrophosphoriques et la libération d'adénine, ainsi que nous l'avons mentionnée plus haut (voir §2.3).

Ainsi, l'hydrolyse acide partielle du polyADPR livre des oligomères d'ADPR tandis que l'hydrolyse pyrophosphatasique partielle livre très vraisemblablement des oligomères de ΨADPR. L'isolement de ces composés confirme donc la structure primaire proposée précédemment (Schéma 6) pour le polyADPR.

4.5 - Longueur des chaînes de polyADPR.

Nous venons de voir qu'il est possible de déterminer le nombre de molécules d'ADPR présent dans les oligomères d'ADPR en mesurant le rapport ADPR/5'AMP après hydrolyse à la

pyrophosphatase. On peut évidemment déterminer de la même façon le nombre de molécules d'ADPR présentes dans le polyADPR intact en mesurant dans l'hydrolysat pyrophosphatasique le rapport ΨADPR/5'AMP. Nous avons procédé à cette détermination sur les fractions I, II et III de polyADPR isolé après chromatographie sur DEAE cellulose(Figure 1). Les résultats concernant la fraction II ont déjà été présentés dans la figure 3 montrant la séparation du 5'AMP et du ΨADPR sur colonne de Dowex. L'ensemble des résultats relatifs aux fractions I, II et III est résumé dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

COMPOSITION DES HYDROLYSATS PYROPHOSPHATASIQUES DES FRACTIONS I, II ET III OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE DE POLYADPR SUR COLONNE DE DEAE CELLULOSE

(Valeurs exprimées en pourcentage de l'absorption U.V. totale)

	Fraction I	Fraction II	Fraction III
ΨADPR	49 %	94 %	97,5 %
5'AMP	51 %	6 %	2,5 %
Longueur moyenne des chaînes	2	17	40

On peut en déduire que pour cette préparation de polyADPR 8,7 % du polyADPR (fraction I) ont une longueur de chaîne moyenne d'environ 2 , 80,8 % (fraction II) sur une longueur de chaîne moyenne d'environ 17 et 8,5 % (fraction III) une

longueur de chaîne moyenne d'approximativement 40. En ce qui concerne la fraction III, l'imprécision est assez importante car la détermination d'un aussi faible pourcentage d'AMP est difficile.

3ème Partie

POLY ADENOSINE DIPHOSPHORIBOSE : MISE EN EVIDENCE DE SA BIOSYNTHESE IN VIVO.

Peut-on démontrer qu'*in vivo* il y a également synthèse de polyADPR?

Répondre à cette question est évidemment d'un grand intérêt pour qui se pose la question de savoir si le polyADPR peut jouer un rôle dans la régulation du métabolisme nucléaire du DPN ou bien si la formation de ce polymère est restreinte aux incubations *in vitro* et est dépourvue de signification physiologique.

De toute façon, il fallait s'attendre à ce que les quantités de polyADPR présentes soient très réduites car ce composé, s'extrayant au phénol comme les acides nucléiques, aurait certainement été signalé par les nombreux chercheurs s'intéressant aux acides nucléiques nucléaires.

Aussi, pour avoir le maximum de chances de le mettre en évidence, avons-nous d'une part, chez l'animal vivant, stimulé la synthèse du DPN et injecté du phosphate radioactif pour le marquer et, d'autre part ajouté un entraîneur froid (polyADPR synthétisé *in vitro*) lors des essais de purification du polyADPR qui aurait éventuellement pu être synthétisé *in vivo*.

FIGURE 12. - Synthèse du DPN chez le poulet de 5 semaines. stimulation par injection de nicotinamide 7 h avant le sacrifice

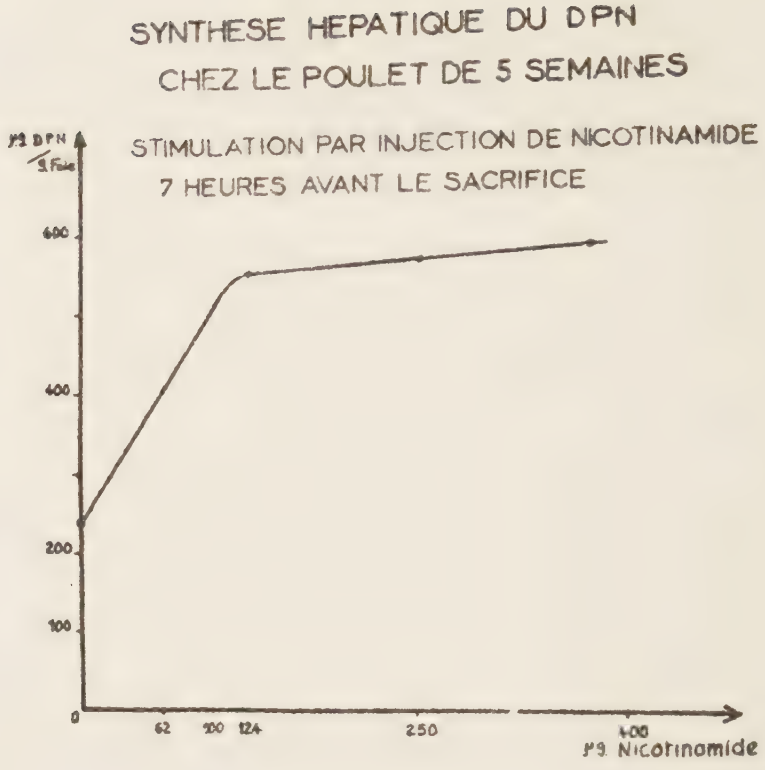
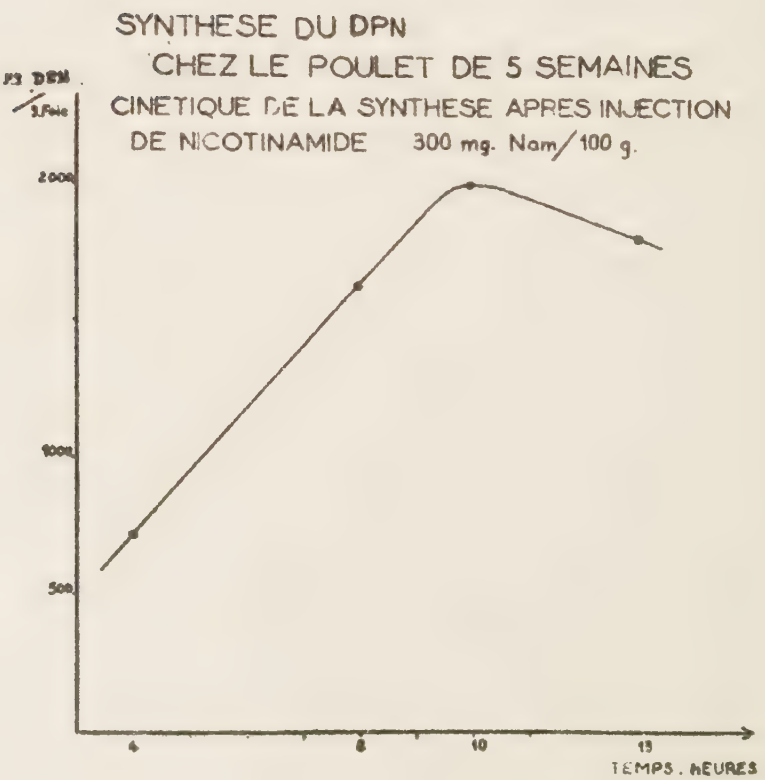


FIGURE 13. - Synthèse du DPN chez le poulet de 5 semaines. Cinétique de la synthèse après injection de nicotinamide (300 mg Nam/ 100 g).



1 - CONDITIONS OPTIMALES POUR LA SYNTHESE DU DPN.

Ainsi, que nous le rappelions dans "Matériel et Méthodes", il est possible de stimuler la synthèse hépatique du DPN en injectant de la nicotinamide aux animaux.

Pour savoir dans quelles conditions il serait possible d'obtenir une augmentation de la synthèse hépatique de DPN chez le poulet, nous avons administré des doses croissantes de nicotinamide par voie intramusculaire et nous avons prélevé les foies 7 h après l'injection. La figure 12 montre qu' à partir de 300 µg de nicotinamide/100 g de poulet, on atteint un plateau correspondant à une augmentation de la concentration intra-hépatique de DPN de l'ordre de 300 p.cent. La figure 13 indique que pour cette dose, l'augmentation de la concentration hépatique de DPN est maximale 10 h après l'administration de nicotinamide. Aussi avons-nous décidé d'injecter 300 µg de nicotinamide/100 g de poulet et de tuer les animaux 10 h plus tard.

2 - PURIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VIVO.

Nous avons administré à 60 poulets de 5 semaines, la dose de nicotinamide indiquée plus haut et, après un délai de 5 h, 8 mCi de $[P^{32}]PO_4H_3$ sont injectés par voie intramusculaire à chaque animal. Les animaux sont sacrifiés 5 h plus tard et les foies sont rapidement prélevés ; les noyaux sont préparés selon la méthode de CHAUVEAU (voir"Matériel et Méthodes"). Dans nos conditions expérimentales l'activité spécifique du

TABLEAU XV

ESSAI D'HYDROLYSE PAR LES RNases T_1 ET T_2 DU POLY $[p^{32}]$ADPR SYNTHETISE IN VIVO

	Hydrolyse par la RNase T_1*				Hydrolyse par la RNase T_2*			
	poly $[p^{32}]$ADPR (50 µg)		RNA de levure (1 mg)		poly $[p^{32}]$ADPR (50 µg)		Acide polyadénylique (200 µg)	
	Témoin	RNase T_1	Témoin	RNase T_1	Témoin	RNase T_2	Témoin	RNase T_2
Radioactivité acido-insoluble (c.p.m.)	950	1000	-	-	3700	3300	-	-
Absorption à 260 mM de la fraction acido-soluble (UDO)	-	-	0,69	20,00	-	-	3,08	3,90

* Voir "Matériel et Méthodes".

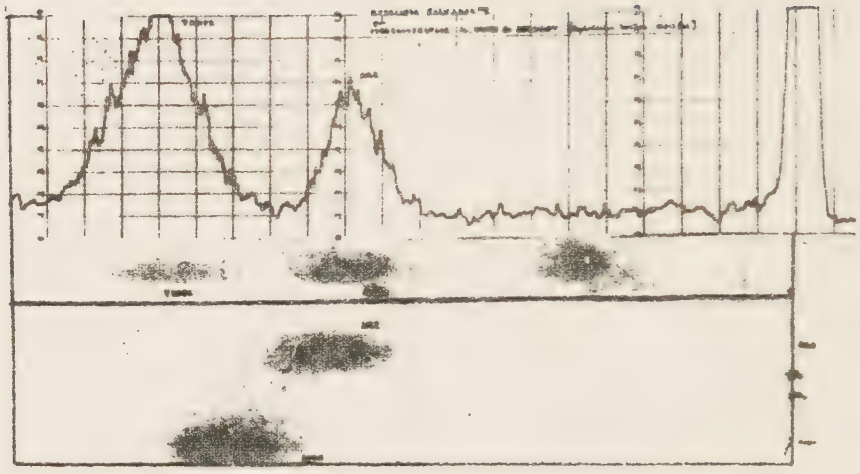
phosphate des nucléosides monophosphates est de l'ordre de 4×10^5 c.p.m./µmole. Les culots de noyaux sont immédiatement lavés par du TCA à 5 p.cent à 0° et séchés par un traitement avec l'alcool froid et l'éther froid. Le résidu est ensuite traité par des enzymes nucléolytiques et protéolytiques selon la méthode exposée dans la deuxième partie pour purifier le polyADPR synthétisé in vitro. Avant de procéder à l'étape de précipitation par le chlorure de magnésium, nous avons ajouté à la préparation 60 mg de polyADPR non marqué comme entraîneur.

Dans ces conditions, et après purification, nous avons obtenu, dans deux expériences différentes, respectivement 6×10^6 c.p.m. et $1,5 \times 10^6$ c.p.m. d'un matériel acido-insoluble dont l'absorption dans l'U.V. est certainement due en majeure partie à l'addition du polyADPR froid.

Cette radioactivité reste acido-insoluble après incubation en présence de RNase T_1 ou RNase T_2 (Tableau XV).

3 - IDENTIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VIVO.

Pour essayer de prouver que le produit ainsi isolé est effectivement du polyADPR, nous avons procédé aux mêmes hydrolyses que celles qui nous avaient permis d'obtenir spécifiquement du pseudoADPR ou de l'ADPR à partir du polyADPR synthétisé in vitro. Nous avons ensuite comparé la migration chromatographique des taches absorbant dans l'U.V. et correspondant aux produits d'hydrolyse du polyADPR entraîneur avec la migration de la radioactivité appartenant aux produits d'hydrolyse du matériel acido-insoluble synthétisé in vivo.



IGURE 14. - Radiochromatographie dans le solvant 3 d'un hydrolyse
e [^{32}P]ADPR par la pyrophosphatase de venin de serpent, 180 min.
37°C ; marqueur 5'AMP et ADPR. Taches actives placées aux Rf du
'AMP et du γADPR.

3.1 - Hydrolyse pyrophosphatasique.

Après hydrolyse poussée par la pyrophosphatase du venin de serpent, nous avons effectué des chromatographies sur papier dans les solvants 1, 2 et 3.

La radioactivité a été révélée soit à l'aide du dérouleur de chromatogrammes Nuclear Chicago, soit par comptage direct de la bande chromatographique au compteur à scintillation de Packard (voir "Matériel et Méthodes").

Dans les trois solvants utilisés, une partie de la radioactivité est localisée au niveau du 5'AMP tandis que la majeure partie de la radioactivité se situe à l'emplacement du pseudo-ADPR. La figure 14 est une illustration du radiochromatogramme obtenu après chromatographie dans le solvant 3.

Cette répartition de la radioactivité est conforme à ce que l'on pouvait attendre de l'hydrolyse pyrophosphatasique du polyADPR marqué. La fraction de la radioactivité qui demeure au départ, ne correspond pas à du polyADPR non hydrolysé puisqu'il ne reste pas de matériel absorbant en U.V. à ce niveau ; sa nature probablement non nucléotidique reste inconnue.

Pour affirmer que la radioactivité se trouvant au niveau du ΨADPR est effectivement inhérente à ce nucléotide, nous l'avons élué et nous avons procédé à une hydrolyse acide douce (HCl 0,01 N) suivie de chromatographie dans les solvants 1, 2 et 3. Rappelons que dans ces conditions, le ΨADPR livre du 5'AMP et du ribose-5-phosphate. Nous constatons que la radioactivité migre effectivement au niveau du ribose-5-

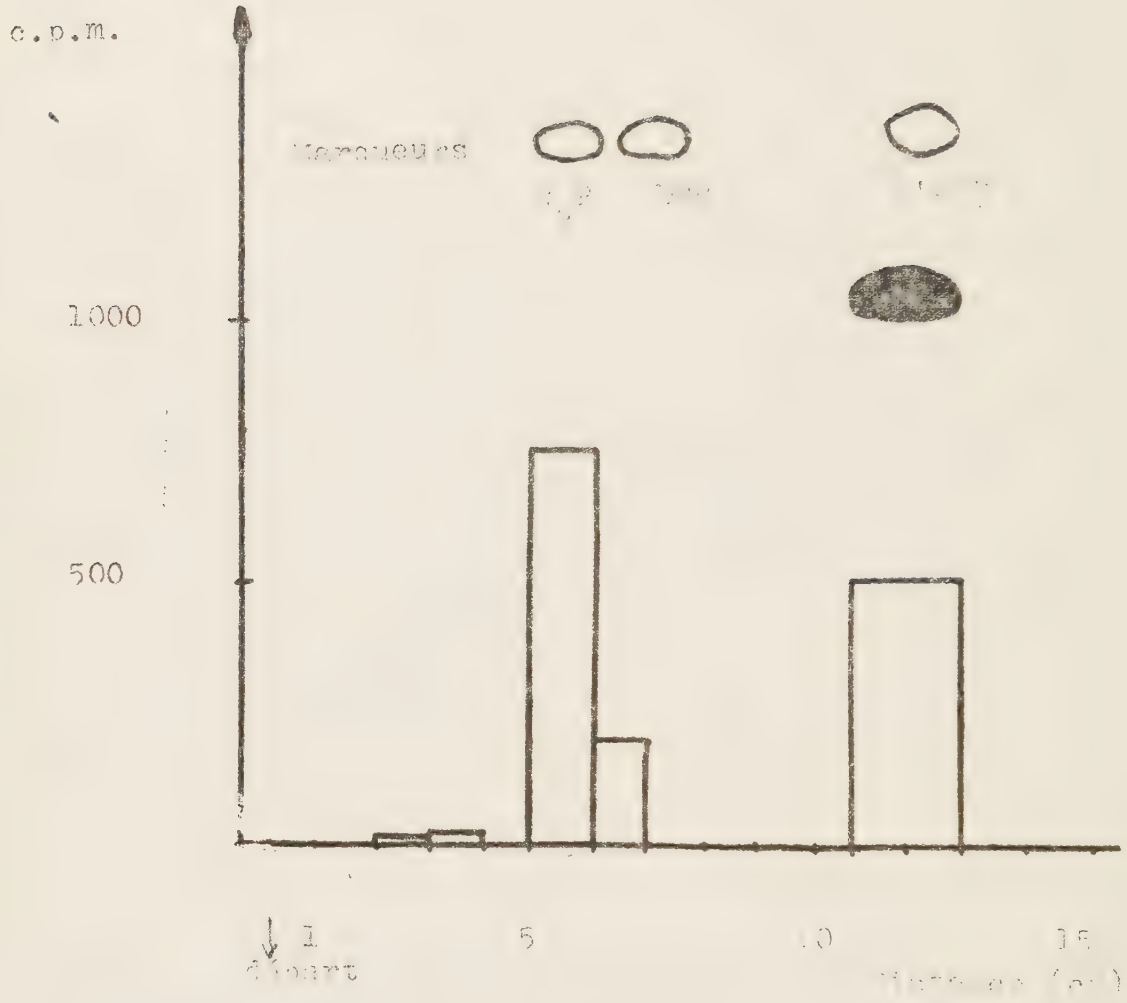


FIGURE 15. - Chromatographie dans le solvant 1 d'un hydrolysat acide du ψADPR provenant du polyADPR synthétisé *in vivo*. Diagramme de radioactivité (comptage direct au compteur à scintillation du chromatogramme cm par cm).
La tache noire représente l'emplacement de tache absorbant dans l'ultra-violet.

phosphate et du 5'AMP conformément à ce que l'on pouvait attendre d'une hydrolyse acide douce du pseuoADPR (Figure 15).

3.2 - Hydrolyse acide.

L'hydrolysat acide (HCl 0,02 N, 18 min. à 100°) du matériel radioactif acido-insoluble obtenu à partir des noyaux de foie de poulet est chromatographié dans différents systèmes de solvants (1, 2 et 3) et la radioactivité est révélée comme plus haut. Les figures 16 et 17 nous montrent deux radiochromatogrammes réalisées dans le solvant 3 après migration de 12 heures et de 24 heures respectivement. Quatre pics sont décelables : l'un reste au départ et correspond probablement au matériel qui resistait déjà à l'hydrolyse pyrophosphatasique, les trois autres correspondent respectivement à l'ADPR, au ribose-5-phosphate et au 5'AMP.

La radioactivité localisée au niveau de l'ADPR est effectivement inhérente à cette molécule : en effet, nous avons élué la tache correspondante à l'ADPR et nous l'avons soumise à une hydrolyse pyrophosphatasique ; nous observons (Figure 18) que la radioactivité migre au niveau du 5'AMP et du ribose-5-phosphate, produits d'hydrolyse spécifiques de l'ADPR par la pyrophosphatase.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le matériel acido-insoluble isolé après injection de nicotinamide et de phosphate radioactif à des poulets, est du polyADPR.

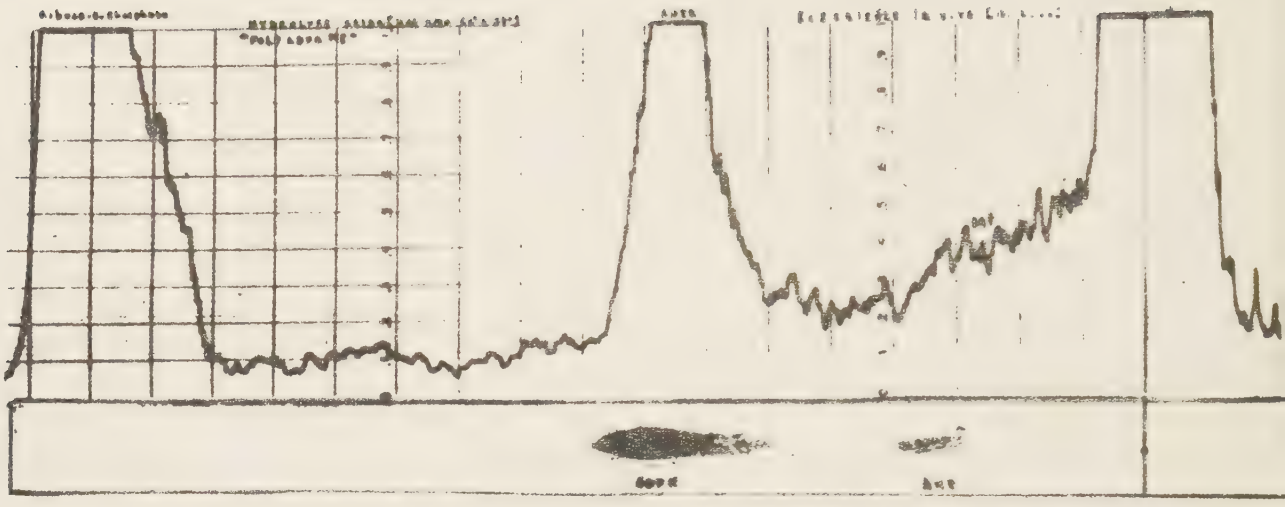


FIGURE 16. - Radiochromatographie (12 heures dans le solvant 3) d'un hydrolysat acide de [P^{32}]polyADPR.

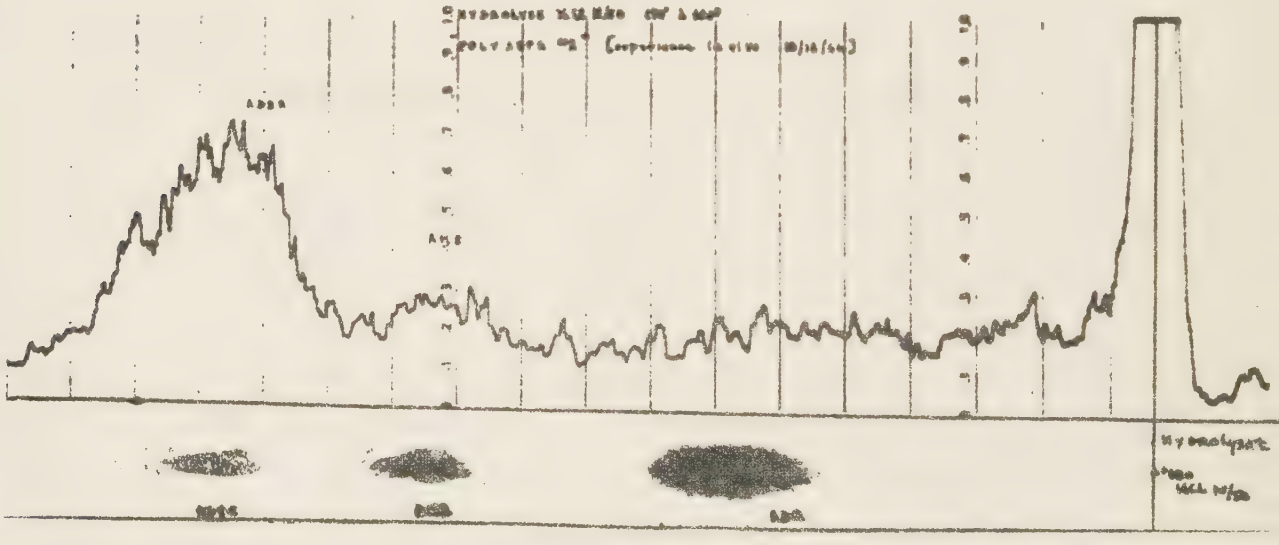


FIGURE 17. - Radiochromatographie (24 heures dans le solvant 3) d'un hydrolysat acide de [P^{32}]polyADPR.

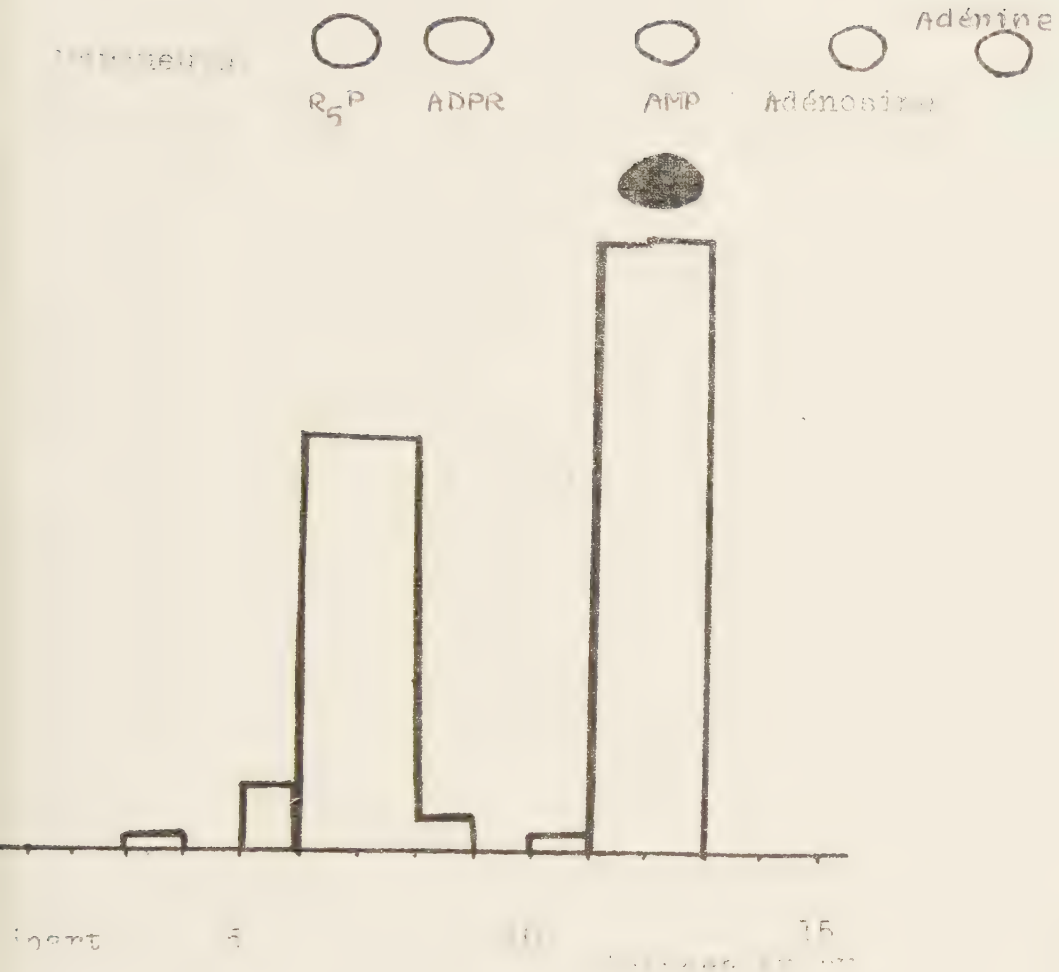


FIGURE 18. - Chromatographie dans le solvant 1 d'un hydrolysat pyrophosphatasique de l'ADPR provenant du poly $[P^{32}]$ADPR synthétisé *in vivo*. Diagramme de radioactivité (comptage direct au compteur à scintillation du chromatogramme cm par cm). La tache noire représente l'emplacement de tache absorbant dans l'ultraviolet.

En effet, la majeure partie de la radioactivité qui lui est associée migre, après hydrolyse, comme le pseudoADPR ou l'ADPR qui sont les produits caractéristiques des hydrolyses pyrophosphatasique ou acide ménagée du polyADPR.

4ème Partie

1-

transférase est essentiellement localisée dans les nucléoles[50].

TABLEAU XVII

INCORPORATION DE $[P^{32}]$DPN DANS DIFFERENTES FRACTIONS NUCLEAIRES

Origine du Foie	Noyau total		Noyau total "sonné"		Nucléole		Chromatine extranucléolaire	
	activité totale*	activité spécifique**	activité totale*	activité spécifique**	activité totale*	activité spécifique**	activité totale*	activité spécifique**
RAT								
Expérience 1	94	7,25	47	2,17	9,95	2,10	7,0	0,15
Expérience 2	30,8	13,5	12,4	1,8	2,12	1,66	8,8	0,6
Expérience 3	159	2,1	51	0,59	1,04	0,40	21,5	0,13
Expérience 4	525	5,25	119	1,55	41,9	0,55	41,5	0,15
Expérience 5	236	6,15	-	-	12,5	2,20	6,6	0,14
POULET	2200	40	-	-	97	13,3	735	0,43

* mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées/8 g de foie initial.

** mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées/ mg de protéine.

S'il en eut été de même pour la polyADPR synthétase l'isolement des nucléoles aurait pu constituer une première étape de la purification. Aussi avons-nous préparé les nucléoles selon BUSCH et coll. (voir "Matériel et Méthodes") et dosé l'activité polyADPR synthétasique dans les nucléoles et la chromatine extranucléolaire. La préparation des nucléoles de foie de rat étant plus aisée que celle des nucléoles de foie de poulet, la majeure partie de nos essais a porté sur les noyaux de foie de rat. Le tableau XVII résume les résultats de nos expériences.

L'activité spécifique de la polyADPR synthétase est indéniablement plus élevée dans le nucléole que dans la chromatine extranucléolaire ce qui suggère que l'enzyme est préférentiellement nucléolaire. Toutefois deux remarques s'imposent : d'une part, avec le mode de préparation des noyaux qui est nécessaire pour obtenir les nucléoles (voir "Matériel et Méthodes"), l'activité présente dans les noyaux est très variable d'une expérience à l'autre : d'autre part, la sonnation des noyaux s'accompagne d'une perte très importante de l'activité polyADPR synthétase et en aucun cas l'activité spécifique de l'enzyme nucléolaire n'est supérieure à l'activité spécifique du noyau sonné. Aussi n'est-il pas possible de conclure à la localisation préférentielle de l'enzyme dans le nucléole, puisqu'aussi bien l'enzyme présent dans la chromatine extranucléolaire pourrait-elle être préferentiellement inactivée durant la sonnation. Devant ces résultats, nous avons renoncé à des fractionnements subnucléaires comme première étape de purification.

TABLEAU XVIII

Extrait enzymatique*	Activité totale/20 g de foie de poulet mμmoles [p32]DPN incorporées	Activité spécifique mμmoles [p32]DPN incorporées/mg protéine
Enzyme agrégée	3750	27,8
Fraction soluble après traitement par la DNase (200 μg/ml) 30 min. à 37° :		
- Incubation normale	56	1,1
- Incubation en présence de 180 μg de DNA de thymus de veau	77	1,4
- Incubation en présence de 180 μg de PES	670	12,6
- Fraction insoluble après traitement par la DNase (200 μg/ml, 30min. à 37°)	0	0

* Voir "Matériel et Méthodes".

2 - ESSAIS DE SOLUBILISATION DE LA POLYADPR SYNTHETASE PAR ACTION DE LA DNase SUR L'ENZYME AGREGEE.

Le tableau XVIII résume les résultats obtenus en essayant de solubiliser la polyADPR synthétase en traitant l'enzyme agrégée par la DNase (fraction insoluble du noyau lysé : voir "Matériel et Méthodes"). Il est évident qu'il y a une très importante perte d'activité lors du traitement par la DNase et que l'activité spécifique de la fraction solubilisée est bien inférieure à celle de l'enzyme agrégée de départ. L'addition de DNA au milieu d'incubation ne provoque qu'une faible augmentation de l'activité soluble, tandis que l'addition de polyéthylène sulfonate (PES) stimule très fortement l'activité solubilisée ainsi que cela avait déjà été noté pour d'autres polyanions. Toutefois, même en présence de PES, l'activité solubilisée représente moins de 20 % de l'activité initiale de l'enzyme agrégée. Aussi,en raison de ce faible rendement, nous nous sommes tournée vers d'autres voies pour essayer de purifier la polyADPR synthétase.

3 - ESSAI DE PURIFICATION DE LA POLYADPR SYNTHETASE SELON LA METHODE DECRITE PAR ATKINSON POUR PURIFIER LA N^{MN} ADENYLYLTRANSFERASE.

ATKINSON[51] avait décrit une méthode permettant de purifier 450 fois la NMN-adénylyltransférase à partir de noyaux de foie de porc. Ainsi que nous l'avons mentionné,cette enzyme est nucléolaire et localisée par conséquent dans la fraction agrégée du lysat nucléaire. Aussi pouvait-on espérer que la

polyADPR synthétase pourrait être solubilisée et éventuellement même purifiée par les méthodes utilisées pour purifier la NMN adénylyltransférase. Dans un premier temps, nous avons simplement suivi l'activité polyADPR synthétase au cours des étapes successives de la purification de la NMN adénylyltransférase.

Le mode opératoire correspond aux premières étapes de la méthode décrite par ATKINSON et coll.[51] et peut être résumé ainsi :

3.1 - Lavage et extraction des noyaux.

Les noyaux de 800 g de foie de poulet sont lavés par 400 ml de tampon A (saccharose 0,25 M - NaCl 0,15 M - phosphate de Na 0,01 M - pH 6,5) pendant 15 min. à 2°, puis centrifugés 20 min. à 19.600 g dans un rotor 40 (Spinco). Les culots de noyaux lavés sont homogénéisés dans 800 ml de Tampon B (PO_4HNa_2 0,2 M pH 8,5 - EDTA 0,1 mM) puis extraits par agitation magnétique 30 min. à 20° et centrifugés 20 min. à 19.600 g dans un rotor 30. On recueille la fraction soluble.

3.2 - Fractionnement à l'acétone.

On procède à une première précipitation par l'acétone 15 % final à -5°C ; le surnageant de centrifugation à 4.000 g pendant 15 min. est ensuite précipité par addition d'acétone à -5° jusqu'à 30 % final ; après centrifugation à 4.000 g pendant 15 min., le surnageant est conservé et le culot (P_{30}) est repris par 15 ml de glycocolle-NaOH, 0,05 M pH 8,4 et dialysé contre 4 fois 6 litres du même tampon additionné d'EDTA 0,1 mM pendant 15 heures à 2°.

Le surnageant est précipité par l'acétone 50 % final à -5° ; après centrifugation, le culot (P_{50}) est également repris par 15 ml de glycocolle-NaOH 0,05 M, pH 8,6 et dialysé comme P_{30}.

3.3 - Adsorption - élution sur hydroxylapatite.

P_{30} est ensuite adsorbé sur 1 g d'hydroxylapatite puis le gel est lavé deux fois par du phosphate de sodium 0,02 M pH 7,0 et élué par du phosphate de potassium bipotassique 0,5 M en agitant 30 min. à 2°.

3.4 - Précipitation au sulfate d'ammonium.

L'éluat est précipité par le sulfate d'ammonium entre 25 et 45 p.cent de saturation puis repris dans de l'eau distillée et il est dialysé contre de l'eau distillée pendant 18 heures à 2°.

Comme nous le verrons plus loin, en utilisant cette méthode et en incubant en présence de PES, nous avons obtenu dans les meilleures expériences 50 % de l'activité initiale dans P_{30} avec une purification d'environ 3 fois, tandis que l'activité était très faible dans les fractions acétoniques 0-15 % et P_{50}.

Toutefois la quantité d'enzyme retrouvée dans P_{30} variait assez fortement d'une expérience à l'autre sans raison apparente. Si dans les meilleures expériences le rendement était de 50 %, dans un grand nombre d'autres essais il ne dépassait pas 10 %.

Par contre, les deux étapes suivantes d'adsorption élution sur hydroxylapatite et de précipitation par le sulfate d'ammonium entraînaient régulièrement une perte très importante de

l'activité polyADPR synthétase sans purification appréciable. Aussi avons-nous décidé de conserver les deux premières étapes et d'essayer de purifier P_{30} par d'autres méthodes.

4 - ESSAIS DE MODIFICATIONS DE LA METHODE D'ATKINSON POUR PURIFIER P_{30}.

Des essais de fractionnement sur DEAE cellulose, CM cellulose, Sephadex G_{200}, aboutirent à une perte importante d'activité (environ 60 %) sans purification notable. Il en fût de même en utilisant des colonnes d'hydroxylapatite à faible force ionique.

Il apparut rapidement que le comportement de l'enzyme était fortement influencé par sa liaison au DNA qui est toujours présent dans la fraction P_{30}. C'est ainsi que l'enzyme n'est pas retenu sur CM cellulose alors qu'il est pratiquement impossible de l'éluer de la DEAE cellulose même à force ionique très élevée ; sur colonne d'hydroxylapatite à faible force ionique l'enzyme est éluée en même temps que le DNA.

Il était évident que l'élimination du DNA conditionnait la poursuite de la purification, car la majorité des protéines présentes dans P_{30} sont basiques (histones) et également fortement liées au DNA. Aussi avons-nous essayé différentes méthodes pour nous débarrasser du DNA. Le traitement par la DNase s'accompagnant d'une perte d'activité très importante, nous avons essayé deux autres méthodes.

4.1 - Essais de traitement de P_{30} par la méthode d'ALBERTSON.

Cette méthode[53] met à profit les solubilités différentielles des acides nucléiques et des protéines dans un système biphasique contenant d'une part du dextrane, et d'autre part, de l'éthylène-glycol/eau.

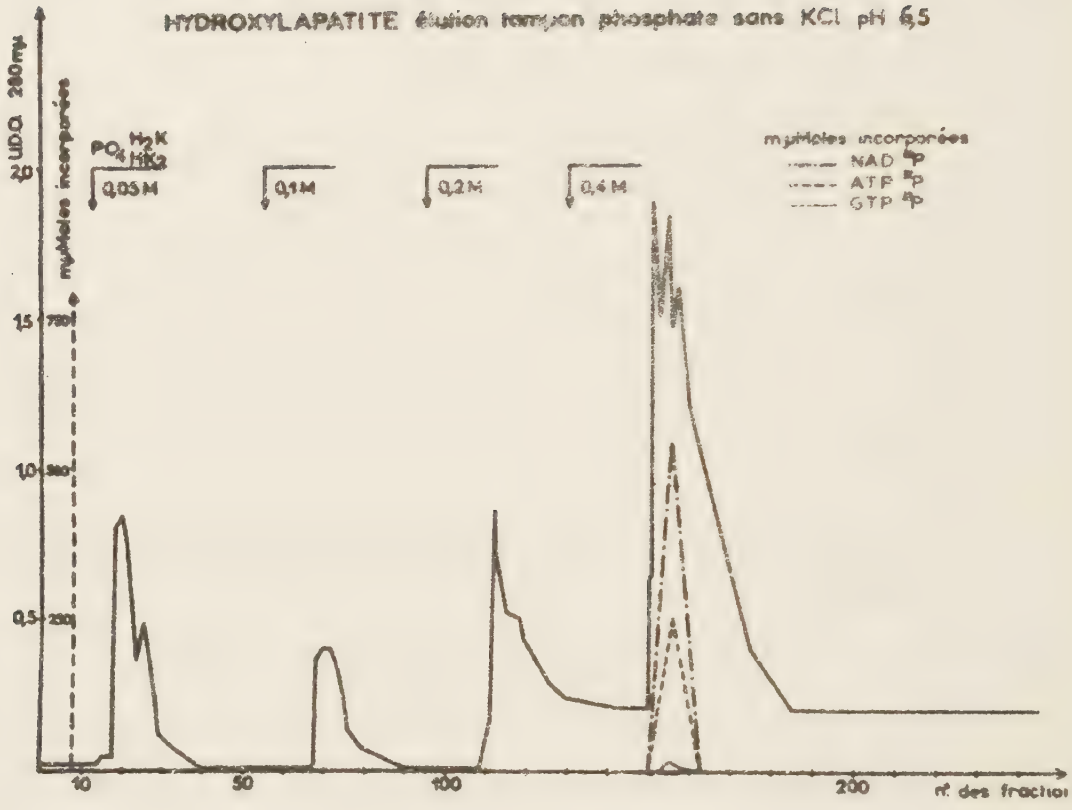
Bien qu'ayant fait varier les concentrations des divers composants des deux phases, nous avons éprouvé des difficultés pour obtenir le DNA uniquement dans la phase dextrane. D'autre part, nous avons enregistré une importante diminution de l'activité polyADPR synthétase au cours de ces opérations sans purification notable.

4.2 - Essais de colonnes d'hydroxylapatite à force ionique élevée.

Les travaux de BERNARDI et coll.[52] montraient qu'il était possible de séparer les histones du DNA en réalisant une chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite à très haute force ionique (KCl jusqu'à 3 M).

Nous avons utilisé cette méthode et étudié les profils d'élution de l'enzyme en fonction de l'augmentation de la force ionique dans le tampon d'élution.

La fraction P_{30} est adsorbée sur colonne d'hydroxylapatite; l'élution en présence ou en absence de KCl est faite par des tampons phosphates de potassium à pH 6,5 de concentrations croissantes. Toutes ces opérations se font à 4°C. Après élution les fractions sont concentrées contre du saccharose solide, puis dialysées contre un tampon glycocolle-



CURE 19. - Profil d'élution de la fraction P_{30} sur colonne hydroxylapatite (25 x 2,4 cm). Elution par des concentrations oissantes de phosphate de potassium.

———— absorption en lumière U.V. à 280 mμ.

—·—·— mμmoles de $[p^{32}]$DPN incorporées/mg de protéine.

– – – – – mμmoles de $[\alpha\text{-}p^{32}]$ATP incorporées en présence de NMN/mg de protéine.

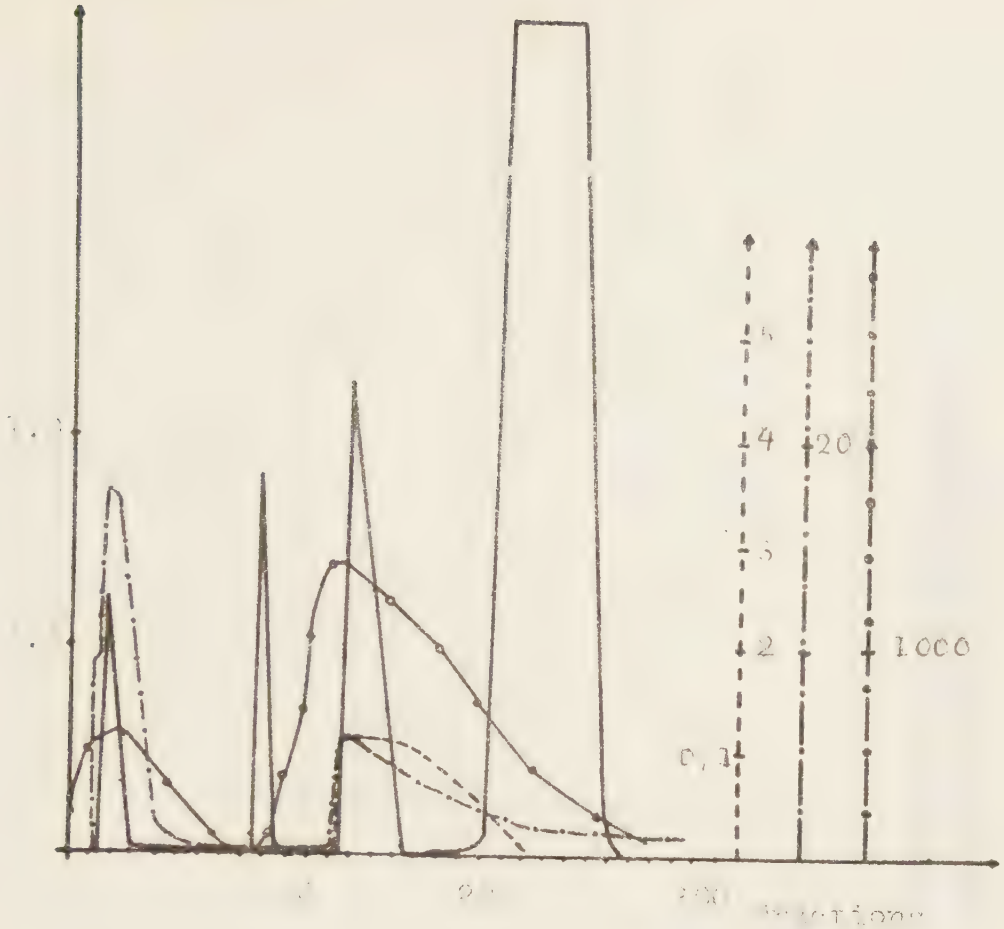


FIGURE 20. - Profil d'élution de la fraction P_{30} sur colonne d'hydroxylapatite (25 x 2,4 cm). Elution par KCl 1M, phosphate de potassium à des concentrations croissantes, débit : 40 ml/h. (volume d'une fraction : 4,3 ml).

Fraction 0 à 70 : PO_4H_2K, HK_2 0,04 M.

Fraction 71 à 125: PO_4H_2K, HK_2 0,1 M.

Fraction 126 à 180: PO_4H_2K, HK_2 0,25 M.

——— absorption en lumière U.V. à 280 mμ.

—·—·—·— mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées/mg protéine : activité spécifique de polyADPR synthétase.

—○—○— mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées par la fraction poly-ADPR synthétase correspondant à 600 g de foie.

– – – – – – mμmoles d' $[\alpha\text{-}P^{32}]$ATP incorporées en présence de NMN par mg de protéine: activité NMN adénylyltransférase.

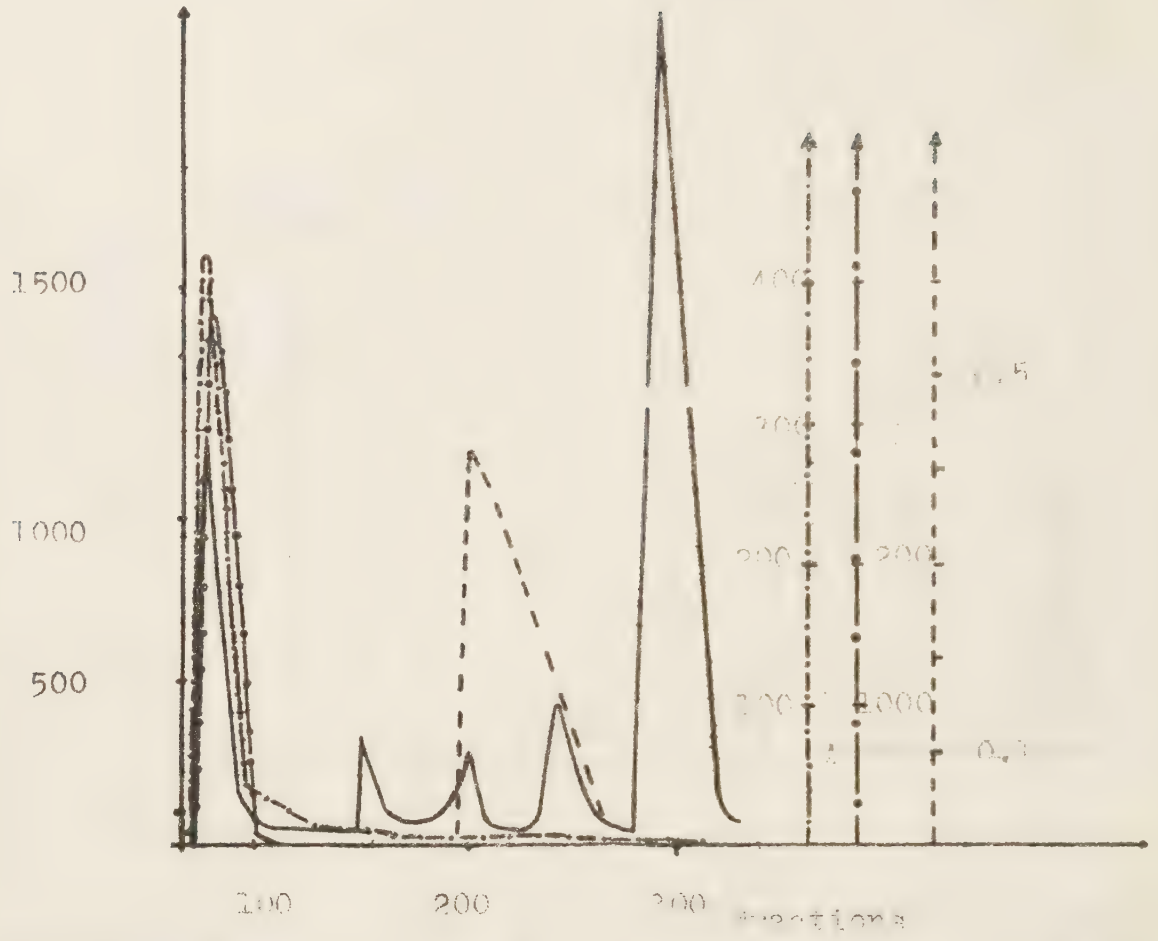


FIGURE 21. - Profil d'élution de la fraction P_{30} sur colonne d'hydroxylapatite (25 x 2,4 cm). Elution par KCl 2 M, phosphate de potassium pH 6,5 à des concentrations croissantes, (débit : 40 ml/h. - volume d'une fraction : 4 ml).

Fraction 0 à 49 PO_4HK_2 H_2K 0,002 M.
Fraction 50 à 89 PO_4HK_2 H_2K 0,005 M.
Fraction 90 à 169 PO_4HK_2 H_2K 0,04 M.
Fraction 170 à 239 PO_4HK_2 H_2K 0,1 M.
Fraction 240 à 299 PO_4HK_2 H_2K 0,2 M.
A partir de la fraction 300 : PO_4H_2K HK_2 0,5 M.

——— absorption en lumière U.V. à 280 mμ.

-•-•-•- mμmoles de $[p^{32}]$DPN incorporées/mg protéine : activité spécifique de la polyADPR synthétase.

—o—o— mμmoles de $[p^{32}]$DPN incorporées par la fraction poly-ADPR synthétase correspondant à 600 g de foie.

- - - - - - mμmoles d' $[\alpha\text{-}p^{32}]$ATP incorporées en présence de NMN par mg de protéine : activité NMN adénylyltransférase

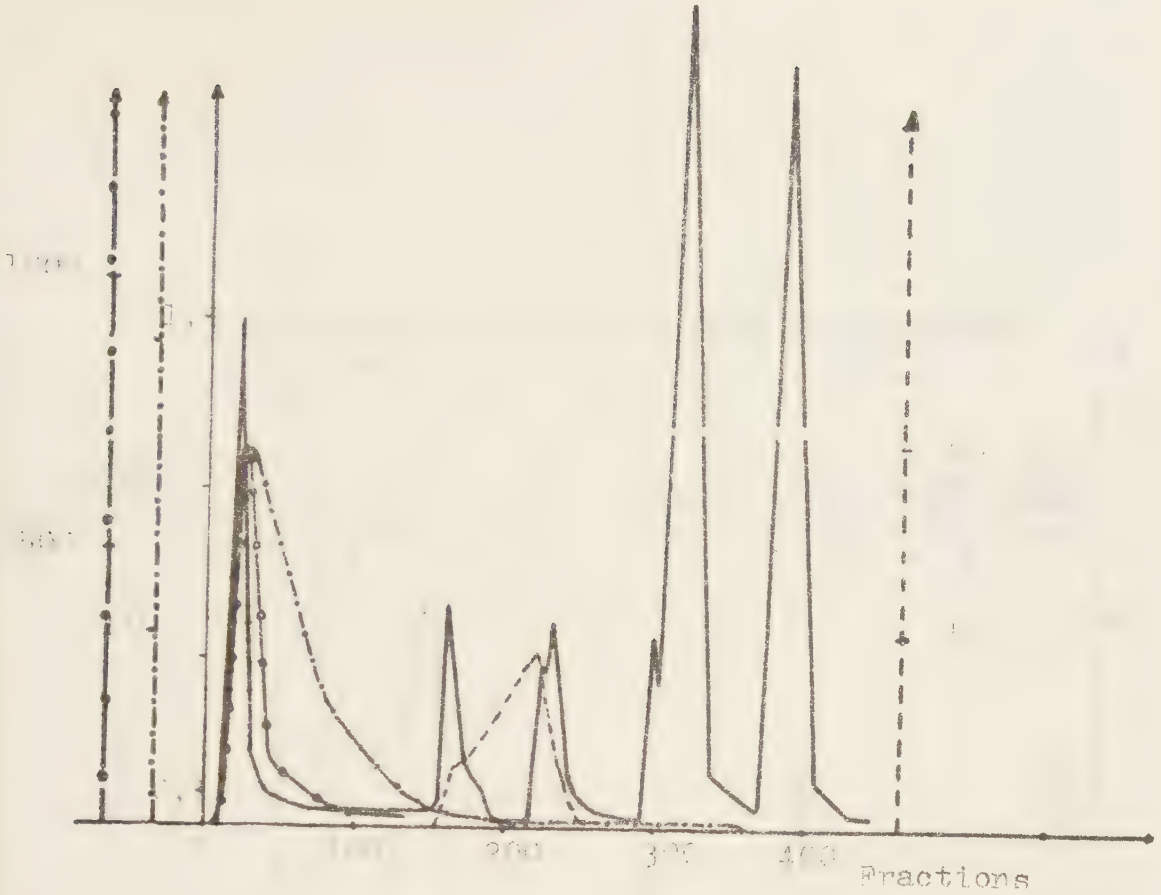


FIGURE 22. - Profil d'élution de la fraction P_{30} sur colonne d'hydroxylapatite (25 x 2,4 cm). Elution par KCl 3M, phosphate de potassium pH 6,5 à des concentrations croissantes (débit : 40 ml/h., fraction : 4,3 ml).

Fraction 0 à 89 PO_4HK_2 H_2K 0,002 M.
Fraction 90 à 140 PO_4HK_2 H_2K 0,005 M.
Fraction 141 à 200 PO_4HK_2 H_2K 0,04 M.
Fraction 201 à 280 PO_4HK_2 H_2K 0,1 M.
Fraction 281 à 360 PO_4HK_2 H_2K 0,2 M.
A partir de la fraction 361 : PO_4H_2 HK_2 0,5 M.

———— absorption en lumière U.V. à 280 mμ.

—·—·—·— mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées/mg protéine: activité spécifique de la polyADPR synthétase.

—o—o— mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées par la fraction poly-ADPR synthétase correspondant à 600 g de foie de poulet.

- - - - - - - mμmoles de $[\alpha\text{-}P^{32}]$ATP incorporées en présence de NMN par mg de protéine : activité spécifique de la NMN adénylyltransférase.

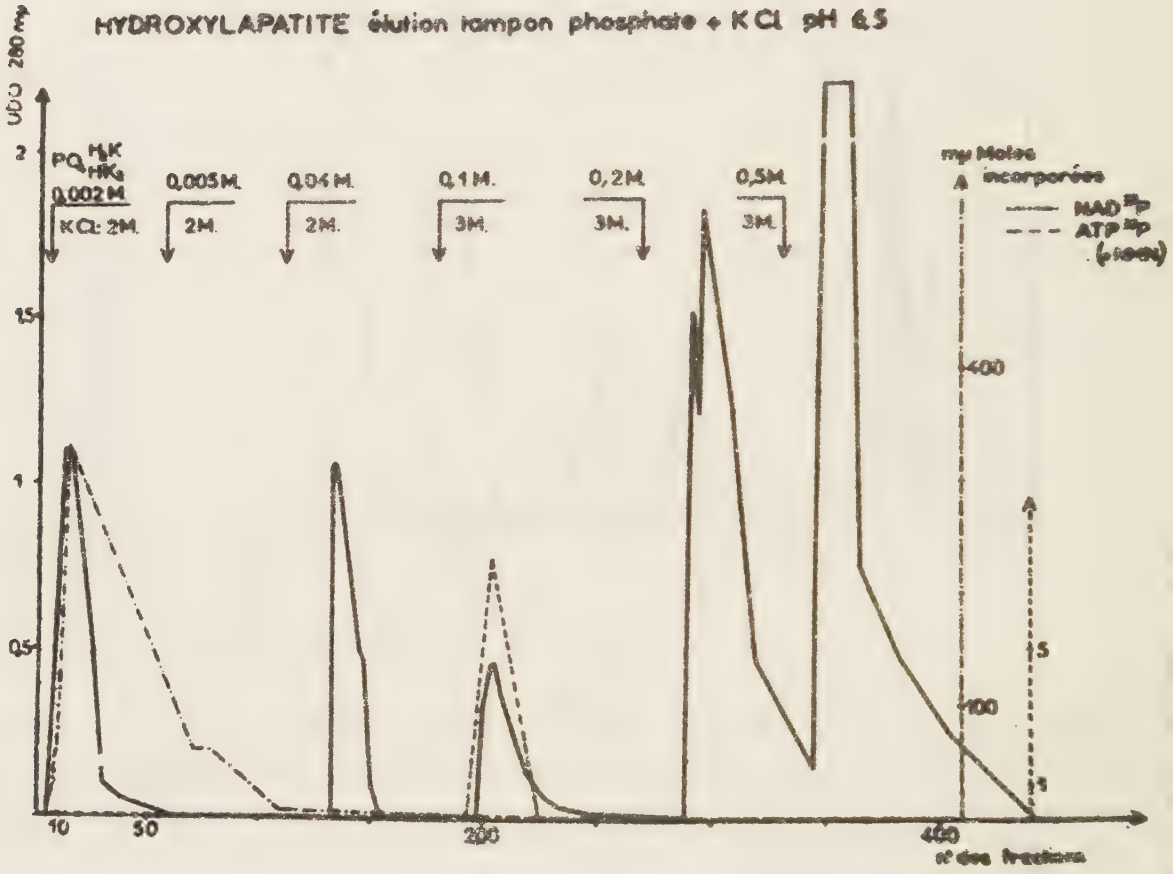


FIGURE 23. - Profil d'élution de la fraction P_{30} sur colonne d'hydroxylapatite (25 x 2,4 cm). Elution par des concentrations croissantes de phosphate de potassium et de KCl.

———— absorption en lumière U.V. à 280 mμ.

—·—·— mμmoles de $[p^{32}]$DPN incorporées/mg de protéine = activité polyADPR synthétasique.

– – – – – mμmoles de $[\alpha\text{-}P^{32}]$ATP incorporées en présence de NMN/mg de protéine = activité NMN adénylyltransférasique.

NaOH 0,05 M, pH 8,6, mercaptoéthanol 0,01 M, EDTA 0,5 mM.

Les incubations ont été faites en présence de 180 µg de PES par incubation. L'activité polyADPR synthétase est suivie par l'incorporation du $[P^{32}]$DPN dans un produit acido-insoluble tandis que l'activité NMN adénylyltransférase est suivie par l'incorporation d' $[\alpha\text{-}P^{32}]$ATP en présence de NMN. Notons que cette méthode ne permet de décoler la présence de NMN adénylyltransférase qu'en présence de polyADPR synthétase capable de transformer le $[P^{32}]$DPN éventuellement synthétisé en polyADPR acido-insoluble.

L'examen des figures 19 à 23 montre :

1) que sans KCl la NMN adénylyltransférase comme la polyADPR synthétase sont élués avec la majeure partie du DNA par le tampon phosphate de potassium 0,4 M (Fig.19).

2) qu'en KCl 1 M la séparation de la polyADPR synthétase et de la NMN adénylyltransférase n'est pas complète (Fig. 20).

3) qu'en KCl 2M, les deux enzymes sont bien séparées, mais que la NMN adénylyltransférase "traîne" et est mal séparée du DNA (Fig. 21).

4) qu'en KCl 3 M, les deux enzymes sont bien séparées l'une de l'autre et du DNA, mais que l'activité spécifique de la polyADPR synthétase est plus faible qu'en KCl 2 M (Fig.22)

5) que le meilleur profil est obtenu en éluant la polyADPR synthétase en milieu 2 M, puis la NMN adénylyltransférase en milieu KCl 3 M (Fig. 23).

TABLEAU XIX

PURIFICATION DE LA POLYADPR SYNTHETASE

(Valeurs pour 360 g de foie de poulet)

	volumes ml	mg protéines	Activité totale	* Activité spécifique	* Rendement % Purification
Enzyme brute (extrait nucléaire)	180	1750	55000	31,5	100
Fraction acétonique (15 à 30 %)	20	300	32400	108	59
Eluat de l'hydroxylapatite KCl 2M, PO_4HK_2 H_2K 0,002M					
PicI Fraction 1	7,5	6,1	2440	400	4,4
PicI Fraction 2	3,0	8,2	1800	206	3,3
PicI Fraction 3	3,0	5,1	980	192	1,77
PicI Fraction 4	3,1	2,8	198	71	0,36
Total :		22,2	5418		9,9

* mesurée par incorporation de [P^{32}]DPN en présence de PES.

4.3 - Bilan de la purification de la polyADPR synthétase en utilisant la méthode d'ATKINSON modifiée par l'introduction d'une colonne d'hydroxylapatite à force ionique élevée.

Le bilan d'une purification obtenue en modifiant la méthode d'ATKINSON en soumettant P_{30} à une chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite dans les conditions décrites dans la figure 23, est donné dans le tableau XIX.

On constate que la fraction I d'hydroxylapatite a été purifiée environ 12 fois avec un rendement de l'ordre de 4 %. Une précipitation de cette fraction par le sulfate d'ammonium (30 à 80 %) nous permettait d'augmenter l'activité spécifique de cette fraction d'environ 5 fois en conservant environ 75 % de l'activité.

Il s'agissait là de résultats encourageants mais, ainsi que nous l'avons déjà noté, l'étape de la précipitation par l'acétone est très peu reproductible pour des raisons inconnues et si, dans le bilan présenté dans le tableau XIX, la fraction acétonique P_{30} contenait encore 50 % de l'activité initiale, dans d'autres préparations il ne subsistait que 10% de cette activité. Aussi avons-nous abandonné cette méthode bien que la purification obtenue ait été intéressante. Il était, en effet, évident qu'en utilisant cette méthode nous serions obligée de tuer des milliers de poulets pour obtenir une quantité d'enzyme suffisante pour en étudier les propriétés et celles de ses produits de synthèse.

TABLEAU XX

INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA QUANTITE D'ENZYME SOLUBILISEE PAR EXTRACTION DES NOYAUX AVEC UN TAMPON PHOSPHATE DE SODIUM 0,02 M pH 8,5

	Activité[1] pour 20 g de foie de poulet		
	Noyaux préparés selon CHAUVEAU[2]	Activité spécifique	Noyaux préparés selon CHAUVEAU et lavés par le tampon A[3]
Lysat nucléaire total	5240	30,4	2600
Fraction solubilisée par tampon B[4] et dialysée contre tampon C[5]			
- Extraction 20' à 2°	4800	-	2460
- Extraction 20' à 20°	5250	45,5	2430
Fraction soluble après 15 h de dialyse à 4° contre tampon C + 500 µg DNase/ml			
- Incubation sans PES	285	5,0	-
- Incubation en présence de PES	1060	18,6	-

(1) Incubation en présence de 180 µg de PES. Voir "Matériel et Méthodes". Activité exprimée en mµmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées.

(2) Voir "Matériel et Méthodes".

(3) Saccharose 0,25 M, NaCl 0,15 M, phosphate de Na 0,01 M, pH 6,5.

(4) Phosphate de Na 0,2 M, pH 8,5 , EDTA 0,1 mM.

(5) Glycocolle-NaOH 0,05 M, pH 8,6 , mercaptoéthanol 0,001 M.

Nous avons alors décidé d'essayer de trouver une méthode de purification qui serait plus reproductible, aurait un meilleur rendement et retiendrait le principe de la chromatographie sur hydroxylapatite qui nous permettait de séparer l'activité NMN adénylyltransférase de l'activité polyADPR synthétase.

5 - METHODE RETENUE POUR PURIFIER PARTIELLEMENT LA POLYADPR SYNTHETASE.

5.1 - Préparation de l'extrait nucléaire.

Nous avons supprimé le lavage des noyaux tel que nous le pratiquions en suivant la méthode d'ATKINSON et coll.[51] (voir § 1. ec ..) ; en effet, il entraîne une importante perte d'activité (Tableau XX). On constate, d'autre part, qu'entre 2° et 20° la température à laquelle l'extraction est faite est sans effet sur la solubilisation de l'activité enzymatique, aussi avons-nous régulièrement extrait les noyaux par une agitation magnétique de 20 min. à 20°.

Si l'extrait "phosphate" contient la majeure partie de l'activité enzymatique présente dans le lysat nucléaire, il contient également une importante fraction de DNA.

Malgré notre expérience antérieure malheureuse (voir § 1.) nous avons tenté à nouveau d'utiliser la DNase pour nous débarrasser du DNA. Mais ici aussi le traitement par la DNase entraîne une baisse de l'activité totale de plus de 80 % et une diminution de l'activité spécifique de presque 50 % et cela même en présence de PES (Tableau XX).

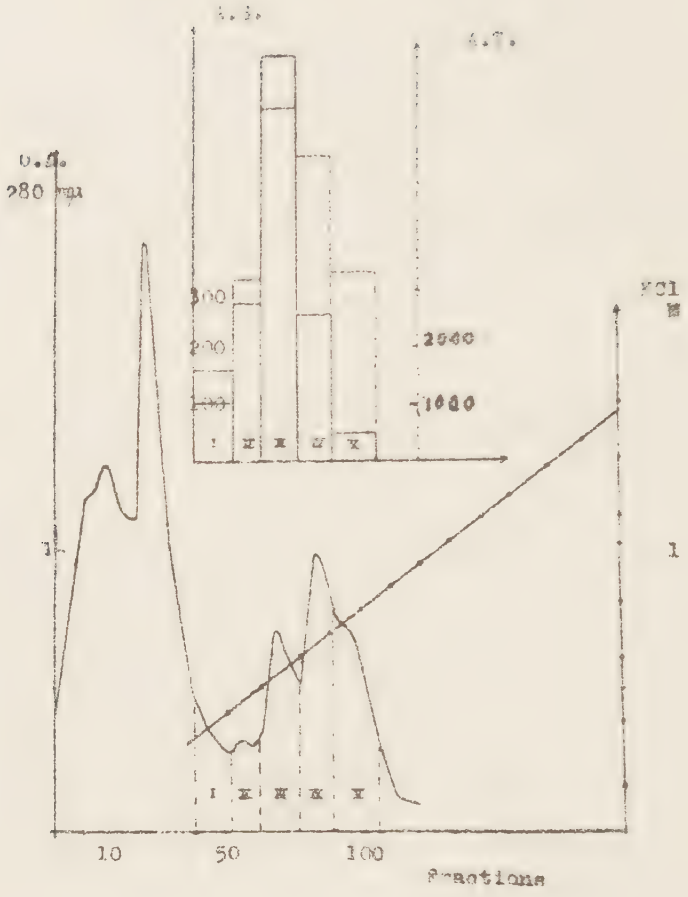


FIGURE 24. - Chromatographie sur colonne de CM cellulose de la polyADPR synthétase (12 x 2,8 cm). Elution par un gradient linéaire de 800 ml de KCl (0,05 - 2 M) dans un tampon glycocolle 0,05 M pH 8,1 de KCl 0,05 M à KCl 2 M. Débit : 66 ml/h ; volume d'une fraction : 3,3 ml.

..... mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées : activité totale (A.T.).

———— mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées/mg protéines (A.S.).

5.2 - Colonne d'hydroxylapatite.

Nous utilisons la colonne d'hydroxylapatite dans les mêmes conditions que celles qui nous avaient permis de séparer la polyADPR synthétase, la NMN adénylyltransférase et le DNA de P_{30} (§ 4.2).

Le tableau XXI indique qu'environ 16 % de l'activité initiale se retrouvent dans la fraction d'hydroxylapatite éluée par un tampon phosphate 0,002 M, KCl 2M. L'enzyme n'est purifiée que 2 fois, mais elle est totalement séparée de la NMN adénylyltransférase et du DNA comme l'indique la très forte stimulation par le PES.

5.3 - Purification sur CM cellulose.

Nous avons essayé de purifier la polyADPR synthétase présente dans l'éluat d'ydroxylapatite sur DEAE cellulose. Nous avons trouvé que l'enzyme n'était pas retenue sur DEAE cellulose à différents pH et que de plus aucune purification n'était obtenue car la grande majorité des autres protéines est fortement basique.

Après des essais de purification infructueux sur phosphocellulose nous avons adopté une chromatographie sur CM cellulose selon les conditions décrites dans la légende de la figure 24. Bien que le profil d'élution soit quelque peu variable d'une préparation à l'autre, l'enzyme est toujours éluée dans une zone assez large entre 0,4 et 0,6 M KCl. Les différentes fractions sont concentrées sur saccharose solide jusqu'à environ 10 ml, puis rapidement dialysées contre 4 fois 6 l de tampon C et conservées à 0° où l'enzyme perd environ 20 % de son activité en une semaine.

TABLEAU XXI

PURIFICATION PARTIELLE DE LA POLYADPR SYNTHETASE

(Valeurs pour 800 g de foie de poulet)

Fractions	volume ml	mg protéines	Activité totale* [^{32}P]DPN	Activité totale* [α-^{32}P]ATP+NMN	Rendement [^{32}P]DPN	Activité spécifique [^{32}P]DPN	Activité spécifique [α-^{32}P]ATP+NMN	Purification [^{32}P]DPN
Lysat nucléaire	200	6.135	283.000			46		
Fraction solubilisée par PO_4HNa_2 0,2 M	360	4.322	324.000	191.000	115 %	75	44	1,6
Eluat d'hydroxylapatite	14	487						
Incubation en absence de PES			6.340			13		
Incubation en présence de PES			51.100	250	18,1	105		2,3
Eluat de CM cellulose**								
- Fraction I	10	16,2	1.720	0		105		
- Fraction II	10	11,5	3.220	0		280		
- Fraction III	10	8,7	6.270	0	2,2	720		16
- Fraction IV	10	21,1	5.400	0		256		
- Fraction V	10	67,5	3.350	0		50		

* Exprimée en pmoles [^{32}P]DPN ou [α-^{32}P]ATP incorporées. Voir "Matériel et Méthodes"

Le tableau XXI montre que la fraction CM III contient environ 2 % de l'activité initiale avec une purification de 16 fois.

Des essais de purification de cette fraction par différentes méthodes de précipitation ont jusqu'à présent entraîné une très forte perte d'activité, aussi utilisons-nous cette préparation comme source d'enzyme partiellement purifiée, bien que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre encore un minimum de 10 bandes protéiques dont en particulier toutes les fractions d'histones.

II. - PROPRIETES DE LA POLYADPR SYNTHETASE PARTIELLEMENT PURIFIEE

1 - EFFET DES POLYANIONS.

Nous avons déjà indiqué à plusieurs reprises que l'activité de l'enzyme débrassée du DNA est stimulée par le PES (voir tableaux XVIII, XX et XXI). Afin de déterminer les conditions optimum de stimulation, nous avons incubé l'enzyme en présence de divers polyanions naturels ou synthétiques. La figure 25 illustre les résultats obtenus.

A la dose de 90 µg par incubation le sulfate de dextrane 500.000, le PES et l'héparine stimulent environ 15 à 20 fois l'activité de l'enzyme, tandis que la stimulation obtenue avec le polyU est d'environ 10 fois. Dans les mêmes conditions le polyADPR, le RNA de levure et le sulfate de dextrane 5-40x 10^6 ne stimulent guère la réaction, tandis que le DNA n'a

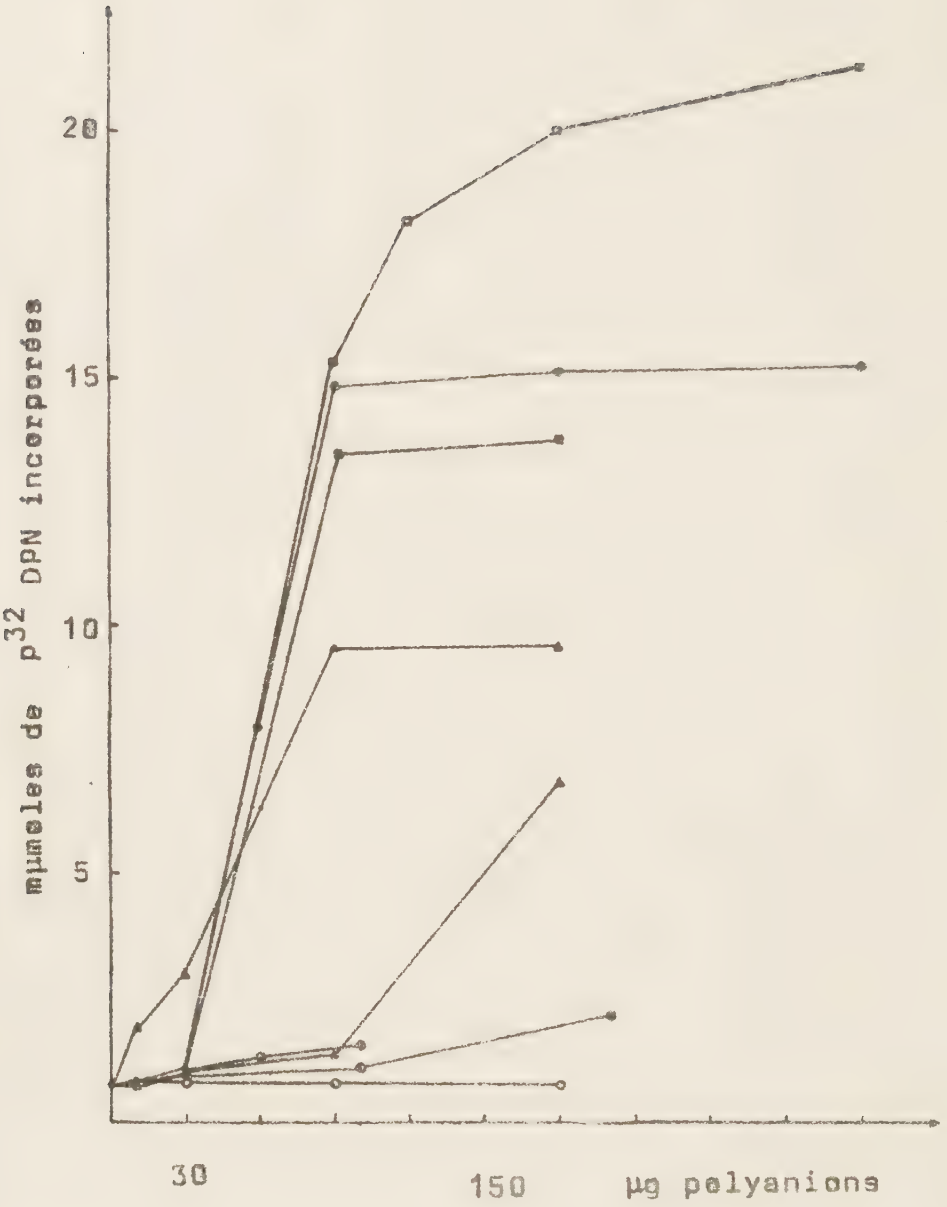


FIGURE 25. - Stimulation par divers polyanions de l'incorporation de [p^{32}]DPN. Milieu d'incubation (volume final 0,25 ml), tampon glycocolle-NaOH pH 8,6 , 0,1 M ; $MgSO_4$, 0,03 M ; β-mercaptoéthanol,0,01 M ; DPN marqué, 1 mM. Incubation 20 min. à 20°. Enzyme : 20 μg de protéine/incubation.

—●—● PES.
—○—○ DNA.
—□—□ Dextrane 500.000. (sulfate)
—■—■ Héparine ~~sulfate~~.
—△—△ Dextrane 40 x 10^6. (s
—▲—▲ polyU.
—◐—◐ RNA.
—◒—◒ polyADPR.

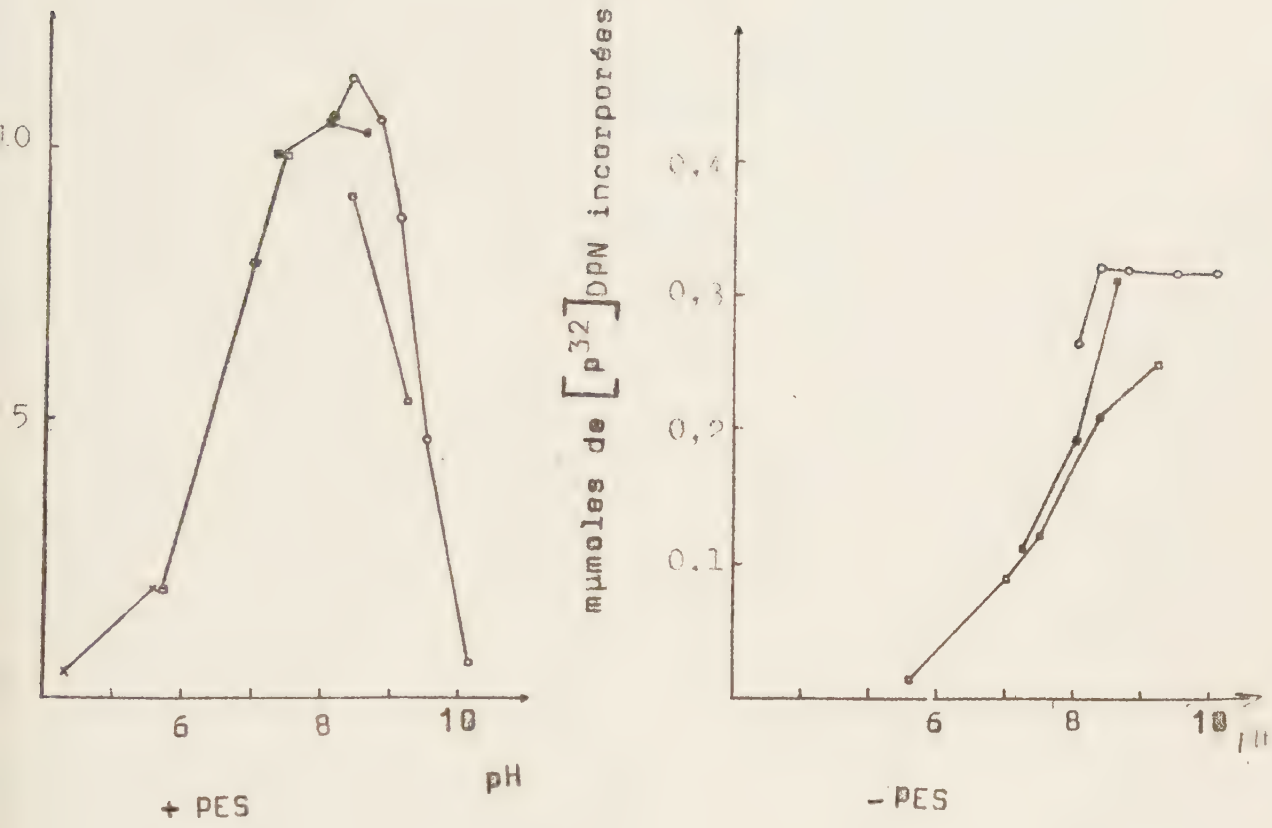


FIGURE 26. - Courbe de pH en présence et en absence de PES. Milieu d'incubation : voir Fig.25, β-mercaptoéthanol, 0,01 M. Incubation 20 min. à 20°. Enzyme : 20 μg de protéine/incubation.

—×—×— Tampon succinate - NaOH.
—□—□— Tampon Tris - maléate.
—■—■— Tampon Tris - HCl.
—○—○— Tampon glycocolle - NaOH.

aucun effet. Pour des concentrations plus élevées la stimulation produite par le sulfate de dextrane 500.000 est encore plus forte (environ 25 fois) tandis que la stimulation obtenue avec les autres polyanions n'augmente pas notablement sauf dans le cas du sulfate de dextrane 5-40 x 10^6.

Le PES ayant un poids moléculaire et une structure bien définis, nous avons utilisé ce polyanion de préférence aux autres pour stimuler la réaction dans nos expériences ultérieures. Nous avons vérifié que les stimulations ne sont pas additives dans le cas du PES, du dextrane sulfate et du poly-ADPR.

2 - pH OPTIMUM.

Le pH optimum de la réaction a été déterminé en présence et en absence de PES à 20°. Quatre systèmes de tampons différents ont été utilisés et le pH final a été déterminé directement dans le milieu réactionnel à 20°. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 26.

On constate qu'en présence de PES l'optimum se situe entre pH 7,5 et pH 8,5 quel que soit le tampon utilisé. Les valeurs sont légèrement plus élevées quand on incube dans un tampon glycocolle-NaOH, aussi avons-nous réalisé nos expériences ultérieures dans ce tampon à pH final 8,1. En l'absence de PES la courbe de pH est toute différente et présente un plateau dans la zone des pH alcalins.

La très nette différence entre les deux courbes de pH en présence et en absence de PES s'explique probablement par la nature de l'interaction entre le PES et l'enzyme qui est basique

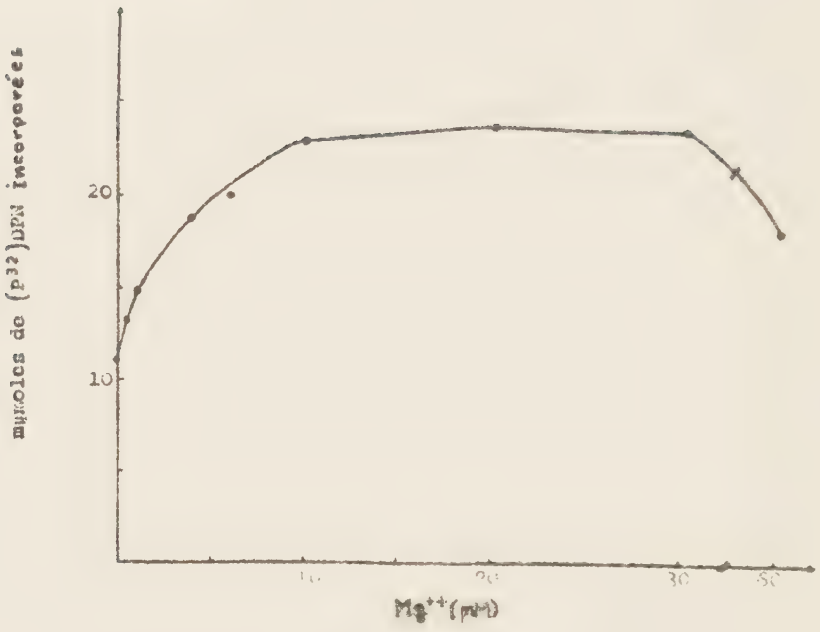


FIGURE 27. - Incorporation de $[p^{32}]$DPN en fonction de la concentration en Mg^{++}. Milieu d'incubation (volume final 0,25 ml): voir Fig. 25, + PES 180 µg/incubation. Enzyme : 40 µg protéine. Incubation 20 min. à 37°.

ainsi que nous l'avons observé lors de sa purification. Dans la zone des pH alcalins les interactions vraisemblablement électrostatiques entre le PES et l'enzyme ne pourraient plus s'établir et il s'en suivrait une chute très rapide de l'activité.

3 - STIMULATION PAR LES CATIONS DIVALENTS.

La figure 27 montre l'effet stimulant de l'ion Mg^{++} sur l'activité enzymatique. Il ne semble pas que l'ion Mg^{++} soit absolument nécessaire pour que la réaction ait lieu mais son addition provoque une stimulation qui, dans les conditions optimum (10 à 30 mM), est environ de deux fois.

Cette stimulation est identique que l'on utilise le chlorure de Mg ou le sulfate de Mg. Dans des conditions analogues, les ions Mn^{++}, Ca^{++} et Zn^{++} provoquent également une stimulation mais plus faible que celle obtenue avec Mg^{++}. L'addition de ces mêmes ions en présence de la concentration optimale de Mg^{++} n'apporte pas de stimulation supplémentaire. Au contraire, l'addition des ions lourds, Hg^{++}, Pb^{++} et Cu^{++} inhibe complètement la réaction à la concentration de 20 mM.

4 - STIMULATION PAR LES GROUPEMENTS-SH.

L'inhibition provoquée par l'addition d'ions lourds, suggère l'existence de groupements-SH dans l'enzyme ; aussi, avons-nous étudié l'effet de l'addition de β-mercaptoéthanol au milieu réactionnel. La figure 28 montre qu'effectivement le β-mercaptoéthanol a un effet activateur et que l'effet maximum est obtenu pour des concentrations supérieures à 0,01M.

IGURE 28. - Incorporation de [P^{32}]DPN en fonction de la concentration en groupements - SH. Milieu d'incubation : voir Fig. 5. PES 180 µg/incubation. Enzyme : 18 µg protéine. Incubation 0 min. à 37°.

5 - CINETIQUE DE LA REACTION.

La cinétique de la réaction a été étudiée entre 10 min. et 180 min., en absence et en présence de PES à trois températures différentes : 20°, 27°, 37°. La figure 29 montre qu'en l'absence de PES, la vitesse de la réaction est pratiquement constante jusqu'à 120 min. Elle diminue ensuite à 37° et à 27°.

Il semble que la vitesse de la réaction soit légèrement plus faible aux temps courts (10 min. et 20 min.), ce qui pourrait suggérer l'existence d'une courte période de latence probablement inférieure à 5 min. avant que la réaction n'atteigne sa vitesse maximale.

En présence de PES (Figure 30) et à 27° ou à 37°, la vitesse de la réaction décroît de façon importante dès 10 min., tandis qu'à 20° on ne note qu'une faible diminution de la vitesse de la réaction entre 10 min. et 20 min.

A 60 min. les valeurs obtenues aux trois températures étudiées sont très proches. On observe ensuite à 37° et à 27° un plateau qui se prolonge au moins jusqu'à 180 min. et qui suggère que la préparation enzymatique ne contient pas d'enzymes pouvant dégrader le produit formé.

A 20° on note encore une faible augmentation entre 60 et 180 min. de telle façon que les valeurs maxima sont obtenues à 20° à 180 min.

L'ensemble de ces résultats indique que les variations de température affectent beaucoup plus la cinétique de la réaction en absence de PES qu'en sa présence, ce qui pourrait suggérer une thermosensibilité particulière de l'enzyme en

FIGURE 29. - Cinétique d'incorporation du $[P^{32}]$DPN en absence de PES en fonction du temps et à différentes températures.

—●—●— à 20°
—X—X— à 27°
—○—○— à 37°

Milieu d'incubation : voir Fig. 25. Enzyme : 20 µg de protéine.

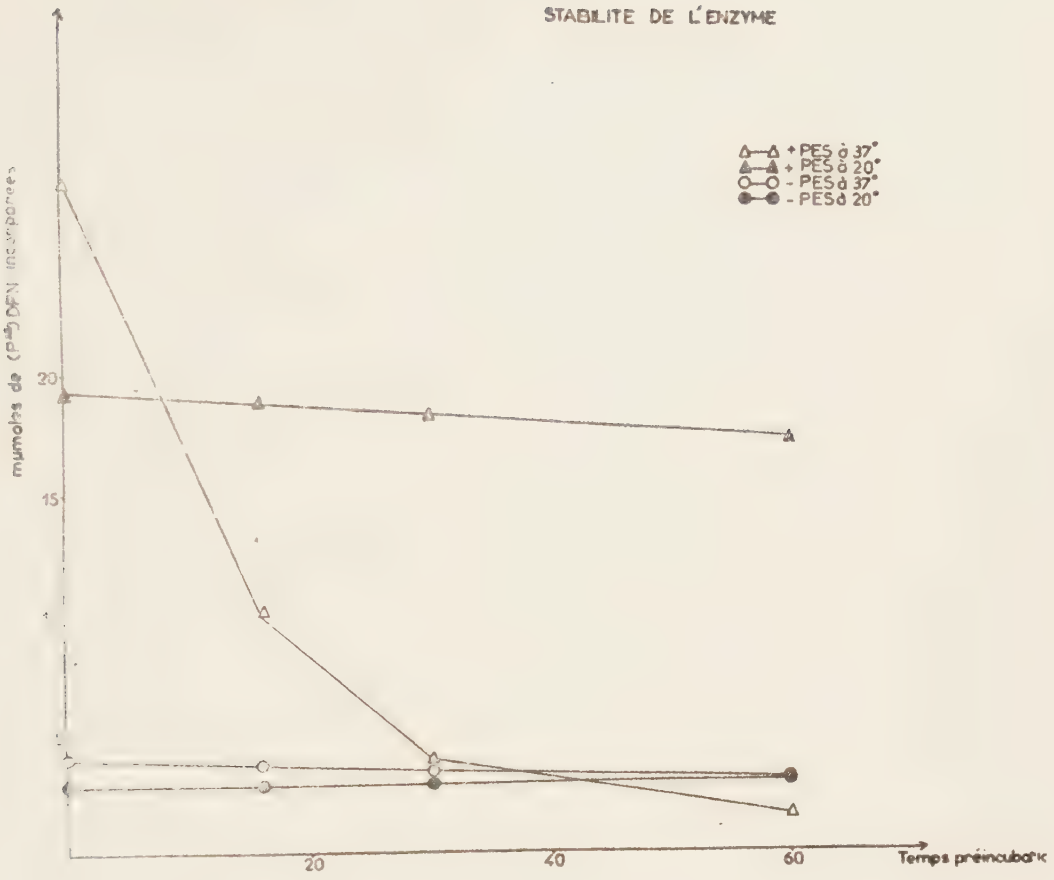


FIGURE 20bis. - 50 µg de polyADPR synthétase partiellement purifiée ont été préincubés à 20° et à 37° en absence et en présence de PES (180 µg) pendant des temps différents dans le milieu d'incubation standard (voir légende Fig.25) en absence de $[P^{32}]$DPN. Après addition de $[P^{32}]$DPN, l'activité enzymatique résiduelle a été mesurée par incubation pendant 20 min. aux mêmes températures.

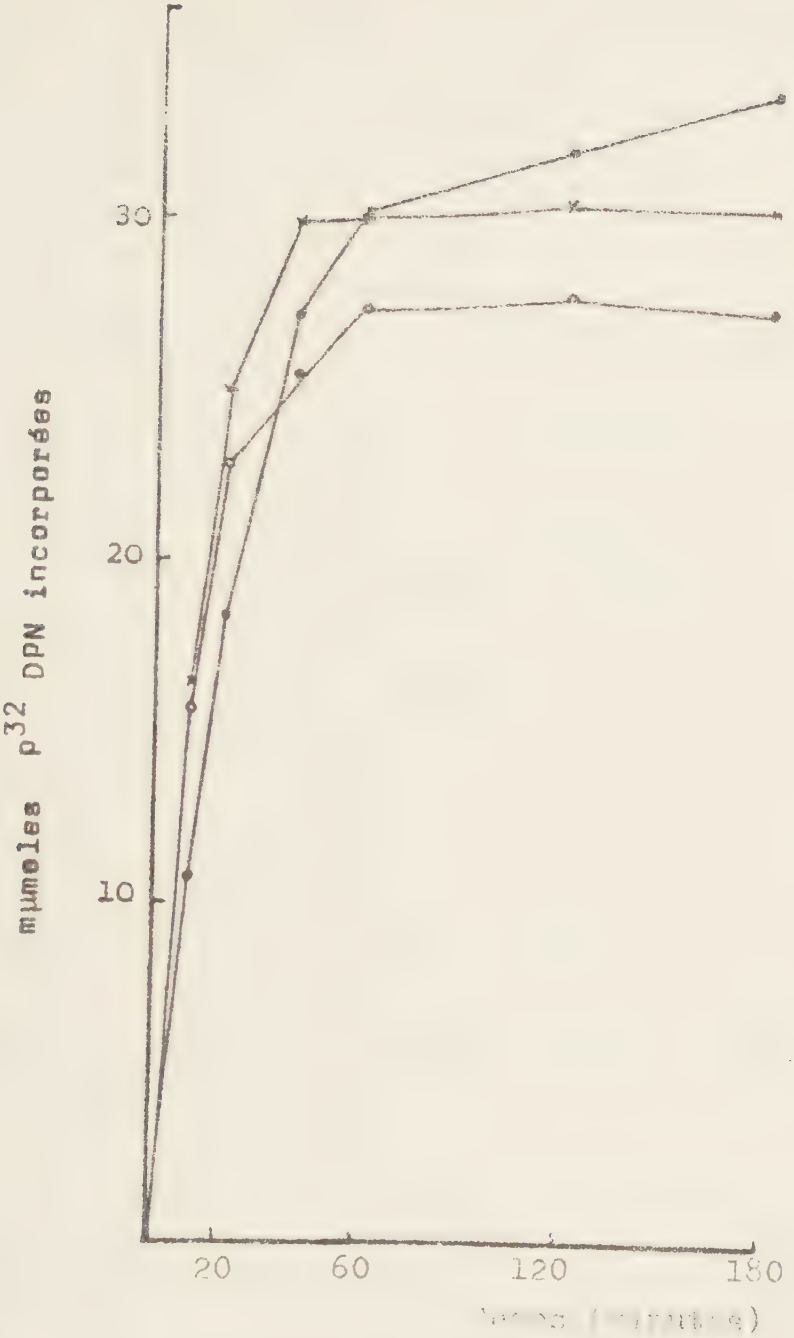


FIGURE 30. - Cinétique d'incorporation du $[p^{32}]$DPN en présence de 180 µg de PES, en fonction du temps et à différentes températures.

—●—●— à 20°

—×—×— à 27°

—○—○— à 37°

Milieu d'incubation : voir Fig. 25. Enzyme : 20 µg de protéine.

présence de PES. La figure 29bis montre qu'en effet, l'enzyme préincubée à 37° en présence de PES perd rapidement son activité, alors qu'il est stable à 20°. Aussi, avons-nous réalisé toutes nos expériences ultérieures à 20°.

6 - PROPORTIONNALITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ENZYME.

La figure 31 montre que, dans les conditions expérimentales adoptées, la quantité de radioactivité rendue acido-insoluble en présence ou en absence de PES est proportionelle à la concentration en enzyme au moins jusqu'à 90 µg d'enzyme par incubation. Il semble qu'en l'absence de PES, la relation ne soit pas strictement linéaire pour des concentrations inférieures à 30 µg de protéines. L'addition dans le milieu d'incubation de 100 µg d'albumine cristallisée ou d'histones purifiées ne modifie pas l'activité enzymatique.

7 - EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LA VITESSE DE LA REACTION.

Les courbes 32 et 33 illustrent les résultats obtenus en incubant 20 min. à 20° en présence de PES et 60 min. à 20° en absence de PES. L'expression graphique de 1/v en fonction de 1/S permet de calculer le Km vis-à-vis du DPN qui est de 2×10^{-4} en absence de PES et de $8,7 \times 10^{-5}$ en présence de PES. Ces résultats suggèrent qu'une fraction de la stimulation de l'activité enzymatique par le PES pourrait être liée à une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le DPN en présence de polyanions.

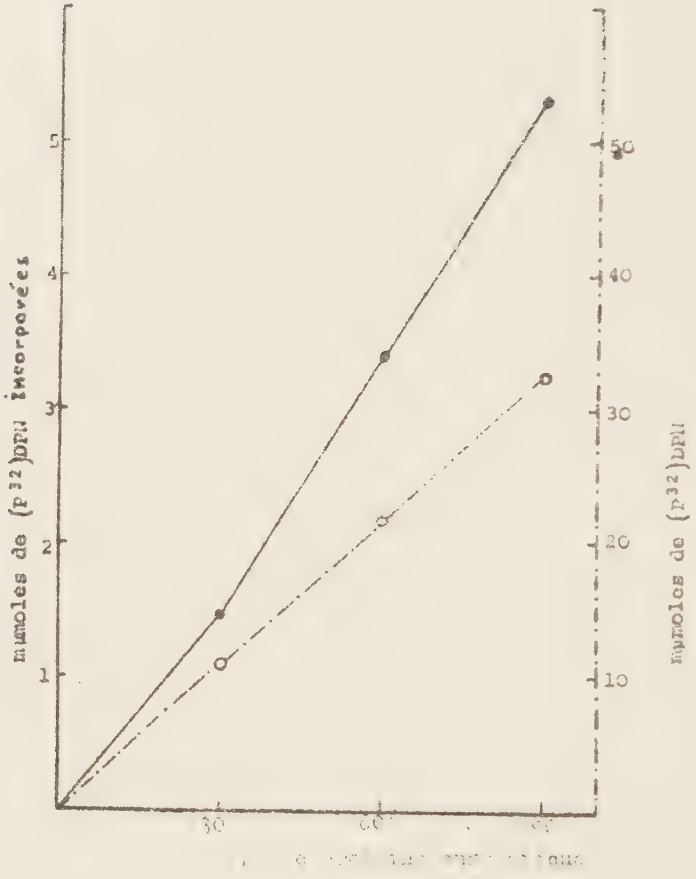


FIGURE 31. - Courbe d'incorporation du $[P^{32}]$DPN en fonction de la concentration en enzyme. Milieu d'incubation : voir Fig. 25.

●——●——● mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées en absence de PES après 60 min. à 20° en présence de 30, 60 et 90μg de protéine enzymatique partiellement purifiée ± 100 μg d'albumine cristallisée par incubation.

○——○——○ mμmoles de $[P^{32}]$DPN incorporées en présence de PES (180 μg/incubation) après 20 min. à 20° en présence de 30, 60 et 90 μg de protéine enzymatique partiellement purifiée ± 100 μg d'albumine cristallisée par incubation.

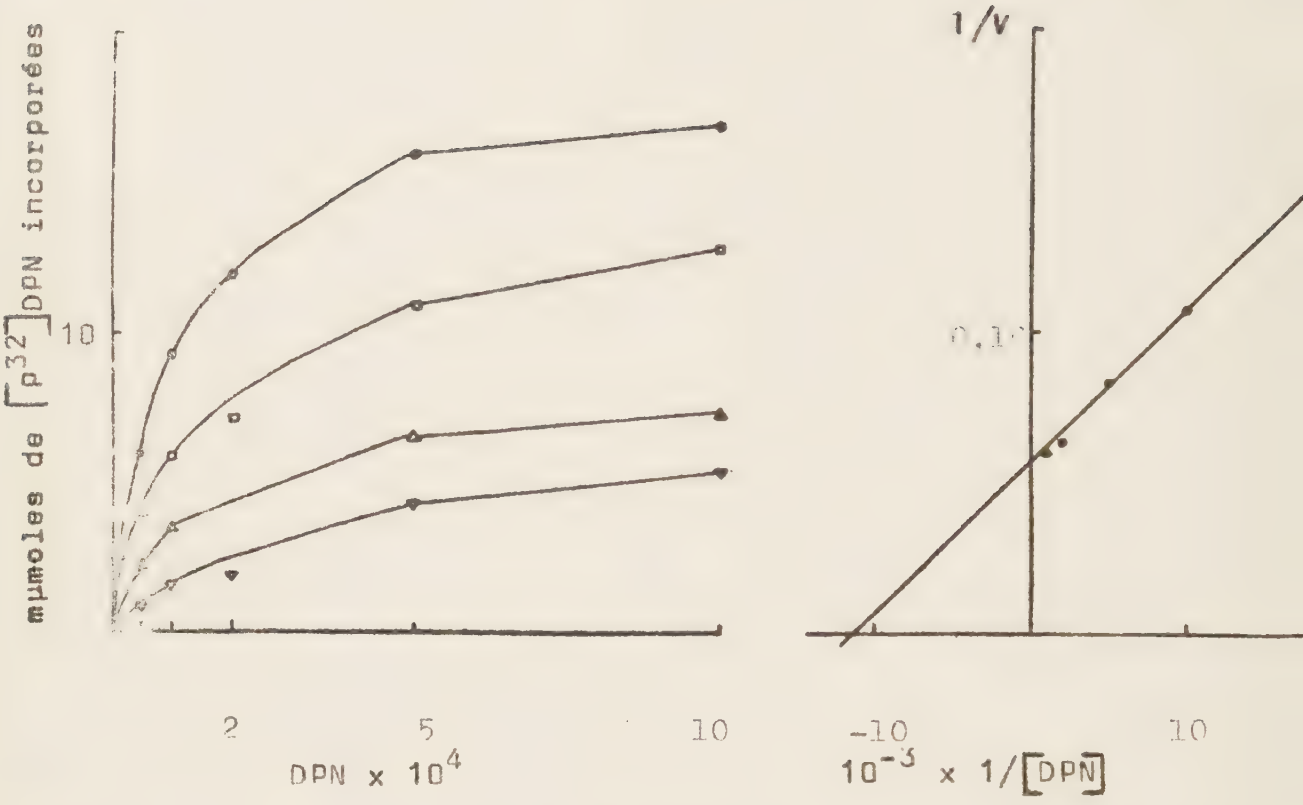


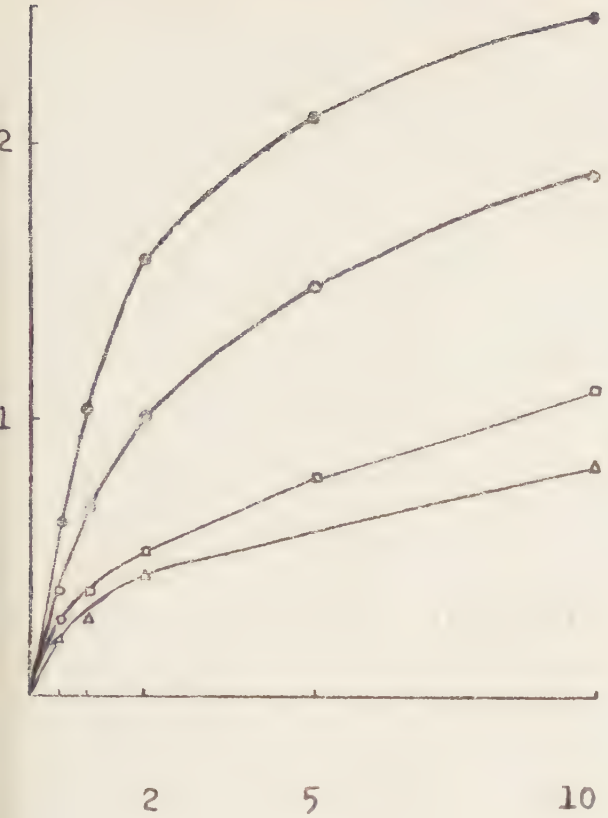
FIGURE 32. - Inhibition de la réaction en fonction de la concentration en nicotinamide et en fonction de la concentration en DPN, en présence de PES (180 μg). Détermination du Km. milieu d'incubation (voir Fig.25), β-mercaptoéthanol 0,01 M, 20 min. à 20°, enzyme : 20 μg de protéine/incubation.

—●—● Nicotinamide = 0.

—□—□ Nicotinamide = $1,6 \times 10^{-3}$ M.

—△—△ Nicotinamide = $6,4 \times 10^{-3}$ M.

—▽—▽ Nicotinamide = $2,56 \times 10^{-2}$ M.



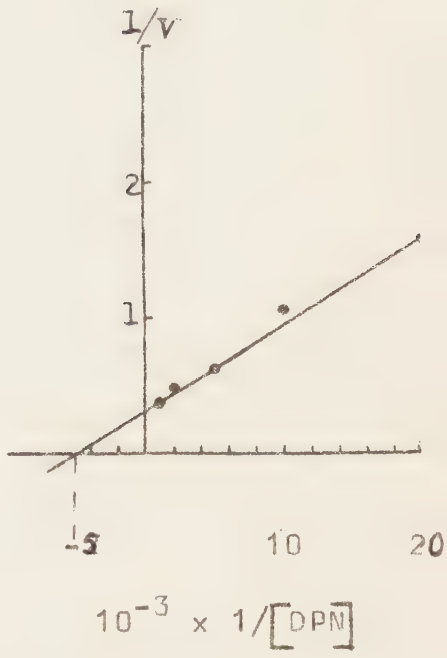


FIGURE 33. - Inhibition de la réaction en fonction de la concentration en nicotinamide et en fonction de la concentration en DPN en absence de PES.

Détermination de Km. Milieu d'incubation (voir Fig. 25), β-mercaptoéthanol 0,01 M, 20 min. à 20°, enzyme : 20 µg/incubation.

—●—●— Nicotinamide = 0.

—○—○— Nicotinamide = 4 x 10^{-4} M.

—□—□— Nicotinamide = 1,6 x 10^{-3} M.

—△—△— Nicotinamide = 6,4 x 10^{-3} M.

8 - EFFET INHIBITEUR DE LA NICOTINAMIDE.

Les figures 32 et 33 représentent également l'inhibition observée en introduisant dans le milieu d'incubation différentes concentrations de nicotinamide. Il est évident que pour une même concentration de nicotinamide, l'inhibition observée est plus importante en l'absence de PES. Il ne semble pas que l'effet du PES soit lié à une interaction directe avec le nicotinamide en l'empêchant d'agir sur l'enzyme car la figure 34 montre que les profils de stimulation par des concentrations croissantes de PES sont très semblables lorsque l'activité est mesurée en absence ou en présence de nicotinamide à diverses concentrations. Nous n'avons pas pu effectuer, jusqu'à présent, une analyse graphique correcte du mécanisme de l'inhibition par la nicotinamide en présence et en absence de PES, car, étant donné les faibles activités mesurées, la précision des essais n'est pas très grande et nous n'avons pas assez d'enzyme pour les répéter autant qu'il le faudrait. Des expériences préliminaires nous donnant des Ki qui sont respectivement de $1,2 \times 10^{-3}$ M et de $2,5 \times 10^{-3}$ M en absence et en présence de PES ; l'inhibition paraît être de type mixte.

9 - REVERSIBILITE DE LA REACTION.

L'étude de la réversibilité de la réaction, c'est-à-dire la synthèse de DPN à partir de polyADPR et de nicotinamide, présente un grand intérêt en relation avec le rôle physiologique possible de l'enzyme. En effet, si la réaction était aisément réversible, on pourrait envisager que le polyADPR soit une forme de réserve de DPN dans les cellules. Par ailleurs, le

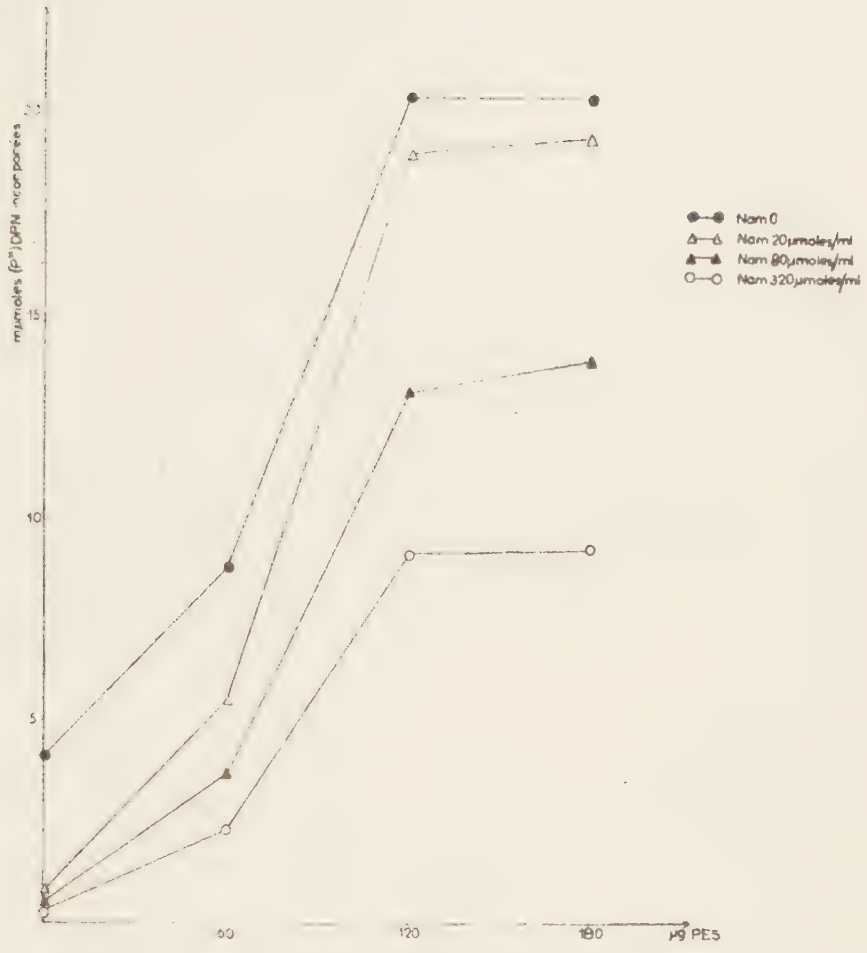


FIGURE 34. - Stimulation par des concentrations croissantes de PES de l'activité polyADPR synthétase en fonction de la concentration en nicotinamide. Milieu d'incubation (voir légende Fig.25) ; protéine enzymatique incubée = 50 µg , pendant 20 min. à 20°.

TABLEAU XXII

ESSAI D'HYDROLYSE DE POLY[P^{32}]ADPR PAR LA NICOTINAMIDE EN L'ABSENCE DE PES

Addition au milieu d'incubation	Radioactivité acido-insoluble (37 mμmoles poly[P^{32}]ADPR) coups/min.
--	5 900
Enzyme	5 920
Enzyme + nicotinamide 1,6 mM	6 040
Enzyme + nicotinamide 25,6 mM	5 960
Enzyme + nicotinamide 80 mM	5 900

Le milieu d'incubation contient dans 0,25 ml : tampon glycocolle-NaOH pH 8,6 0,1 M, $MgSO_4$ 0,03 M, β-mercapto-éthanol 0,01 M. L'enzyme ajoutée correspond à 30 μg de protéines de la fraction III purifiée sur colonne de CMC cellulose. Incubation 20 min. à 37°. Dans le même milieu mais en présence de PES et en absence de nicotinamide l'enzyme incorpore 7,2 mμmoles de [P^{32}]DPN.

rôle inhibiteur de la nicotinamide sur la synthèse du polyADPR nous incitait également à étudier les conditions d'une possible réversibilité de la réaction. A cet égard, nous avons réalisé deux types d'expériences : d'une part, nous avons incubé de l'enzyme en présence de polyADPR radioactif et de nicotinamide et suivi la radioactivité restant acido-insoluble. D'autre part, nous avons incubé l'enzyme en présence de DPN non radioactif et de nicotinamide radioactive puis isolé le DPN pour déterminer son marquage éventuel.

Les résultats correspondants au premier type d'expérience sont résumés dans les tableaux XXII et XXIII.

TABLEAU XXIII

ESSAI D'HYDROLYSE DE POLY [P^{32}]ADPR PAR LA NICOTINAMIDE EN PRESENCE DE PES

Addition au milieu d'incubation	Radioactivité acido-insoluble (40 mµmoles poly[P^{32}]ADPR) coups/min.
--	6 300
Enzyme	6 380
Enzyme + nicotinamide 1,6 mM	6 340
Enzyme + nicotinamide 25,6 mM	6 250
Enzyme + nicotinamide 80 mM	6 300

Le milieu d'incubation contient dans 0,5 ml : tampon glycocolle-NaOH pH 8,6 0,1 M, $MgSO_4$ 0,03 M, β-mercaptoéthanol 0,01 M, PES 180 µg. L'enzyme ajoutée correspond à 50 µg de protéines de la fraction III purifiée sur colonne de CMC cellulose. Incubation

20 min. à 37°. Dans les mêmes conditions l'enzyme incorpore 12 mμmoles de $[P^{32}]$DPN.

Il est évident que dans nos conditions expérimentales le poly-ADPR n'est pas hydrolysé ni en absence, ni en présence de PES, quelle que soit la concentration de nicotinamide utilisée. Des résultats identiques ont été obtenus en incubant à pH acides (pH 6,5 - 6,0) ou en remplaçant le PES par du DNA. Pour réaliser le deuxième type d'expérience nous incubons 600 μg de la fraction III de l'enzyme purifiée sur CM cellulose dans le milieu suivant (volume 2 ml) : glycocolle-NaOH pH 8,6 0,1 M, $MgSO_4$ 0,03 M, β-mercaptoéthanol 0,01 M, DPN non radioactif 0,5 mM. La nicotinamide radioactive est rajoutée aux concentrations de 1,6 mM (activité spécifique : 2×10^6 coups/min./μmole) et 25,6 mM (activité spécifique : $1,2 \times 10^6$ coups/min./μmole), en présence ou en absence de PES (1,44 mg/incubation). Après 1h à 37°, la réaction est arrêtée par addition d'acide perchlorique 0,5 N final, la fraction acido-soluble neutralisée est adsorbée sur Dowex 1 X 8 et la nicotinamide est éluée par lavage avec de l'acide formique 0,001 N. Le DPN est ensuite élué par de l'acide formique 0,1 N. Après lyophylisation le DPN est chromatographié dans le solvant 1 et la radioactivité est mesurée au niveau de la tache de DPN absorbant dans l'ultra-violet. Dans nos conditions expérimentales aucune radioactivité significative n'a pu être décelée à ce niveau, bien que dans le même milieu d'incubation et en absence de nicotinamide, la même quantité d'enzyme incorpore 400 mμmoles de $[P^{32}]$DPN en

TABLEAU XXIV

EFFET DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES SUR L'ACIDO-INSOLUBILITE DU PRODUIT SYNTHETISE PAR L'ENZYME PARTIELLEMENT PURIFIEE

	Activité acido-insoluble *
Incubation-PES	8,6
Incubation-PES, PES (180 µg) ajoutée en fin d'incubation	9,0
Incubation-PES, puis traitement protéolytique	0,6
Incubation + PES (180 µg)	32,8
Incubation + PES (180 µg), puis traitement protéolytique	0,8
Incubation + polyADPR (120 µg)	7,0
Incubation + polyADPR (120 µg) puis traitement protéolytique	0,6

* exprimée en mµmoles de $[P^{32}]$DPN.

Le milieu d'incubation contient dans 0,25 ml : glycocolle - NaOH, pH 8,6 0,1 M, $MgSO_4$ 0,03 M, β-mercaptoéthanol 0,01 M, 50 µg de fraction IV de l'enzyme purifiée sur CMC cellulose. Incubation 120 min. à 20°. Le traitement protéolytique consiste en une incubation de 30 min. à 37° en présence de 50 µg de trypsine et de 50 µg de chymotrypsine.

présence de PES et 80 mμmoles en absence de PES.
L'ensemble de ces résultats indique que la réaction n'est pas réversible du moins dans les conditions expérimentales choisies.

10 - NATURE DU PRODUIT ACIDO-INSOLUBLE SYNTHETISE.

Nous avons essayé de purifier et d'isoler le produit acido-insoluble de la réaction catalysée par l'enzyme partiellement purifiée en utilisant la méthode qui nous avait permis de purifier le polyADPR synthétisé à l'aide d'extraits nucléaires bruts (voir 2è partie, § II).

Le tableau XXIV montre que la majeure partie de la radioactivité initialement acido-insoluble est solubilisée par un traitement protéolytique. Nous avons fait des observations analogues en ajoutant aux incubations du DNA en présence ou en absence de polyADPR. D'autre part, la stimulation provoquée par l'addition de PES n'est pas due à la précipitation par le polyanion d'un matériel qui serait acido-soluble en son absence (tableau XXIV). Des résultats analogues ont été obtenus en utilisant la fraction enzymatique éluée de la colonne d'hydroxylapatite.

L'ensemble de ces résultats indique que l'enzyme partiellement purifiée a perdu la capacité de polymériser l'ADPR du DPN en des chaînes suffisamment longues pour être acido-insolubles. L'intervention possible d'un enzyme contaminant pouvant dégrader le polyADPR n'est pas à retenir puisque, nous l'avons vu (tableaux XXII et XXIII), le polyADPR n'est pas dégradé par

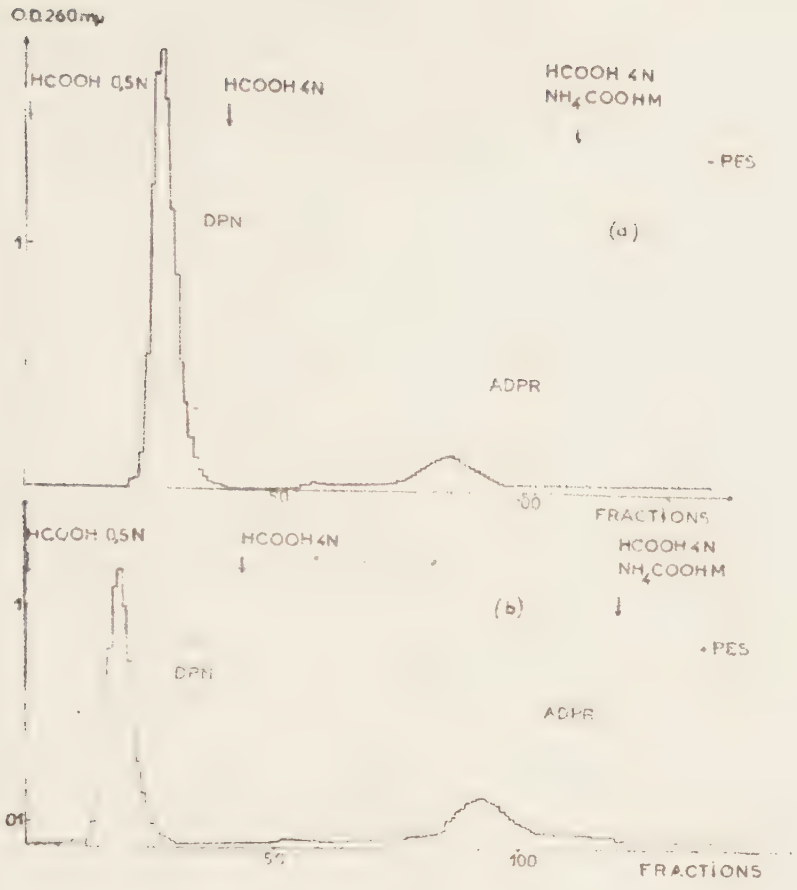


FIGURE 35. - Chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8 sous forme formiate (0,8 x 2,5 cm) des produits acido-solubles obtenus après incubation de l'enzyme partiellement purifiée en présence ou en absence de PES. Conditions d'incubation décrites dans le tableau XXV. Elution par un gradient exponentiel obtenu avec une chambre de mélange de 540 ml (contenant initialement de l'eau) et un ballon réservoir contenant HCOOH 0,5 N ou 4 N ou HCOOH 4 N NH_4COOH 1M. Débit : 100 ml/h , volume d'une fraction : 5 ml.

l'enzyme partiellement purifiée. L'acido-insolubilité observée avant traitement protéolytique serait donc due à une coprécipitation du produit de la réaction avec des protéines. Nous n'avons malheureusement pas assez de matériel pour déterminer la nature du produit de la réaction mais il pourrait s'agir d'ADPR ou d'oligomères d'ADPR. Ce matériel est à rapprocher de celui qui est solubilisé lors du traitement protéolytique du polyADPR synthétisé avec des extraits nucléaires bruts et qui ne précipite pas sous forme de sel de Mg^{++} (2è partie, § II, 4). Il est donc très probable qu'au cours de la purification, certains facteurs nécessaires pour synthétiser du polyADPR à longue chaîne ont été perdus ou bien que l'enzyme a été altérée. Il ne semble pas que les facteurs manquant puissent être soit une amorce de polyADPR, soit du DNA puisque leurs additions sont sans effet.

L'incapacité de l'enzyme partiellement purifiée à synthétiser du polyADPR acido-insoluble est également attestée par l'apparition pendant l'incubation d'ADPR dans la fraction acido-soluble. L'analyse de cette fraction par chromatographie sur Dowex 1 X 8 montre en effet la présence d'ADPR à côté du DPN qui n'a pas été consommé pendant la réaction (Fig. 35). Lorsque la réaction a lieu en l'absence ou en présence de PES, il semble qu'il y ait une relation de proportionnalité entre la quantité de $[P^{32}]$DPN rendue acido-insoluble et la quantité d'ADPR acido-soluble (Tableau XXV). La présence d'ADPR dans la fraction acido-soluble après incubation ne peut être mise sur le compte d'un autre enzyme contaminant du type de la DPN

glycohydrolase microsomique. En effet, ainsi que nous l'avons indiqué plus haut, nous n'avons pas observé de synthèse de DPN radioactif lorsque notre préparation enzymatique a été incubée en présence de nicotinamide radioactive et de DPN froid. Notons enfin, que notre préparation enzymatique partiellement purifiée ne contient pas d'autres enzymes contaminantes susceptibles de dégrader le DPN puisqu'il n'y a ni AMP, ni NMN dans la fraction acido-soluble après incubation.

D I S C U S S I O N

1 - SYNTHESE, PURIFICATION ET STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR.

Nos résultats démontrent clairement que les extraits bruts particulaires des noyaux de cellules animales et plus particulièrement ceux du foie de poulet, contiennent une enzyme capable de rendre acido-insoluble la fraction ADPR du DPN. Depuis sa publication préliminaire[54], cette obtention a été confirmée par 4 laboratoires[55,56,57,58]. L'isolement du produit de la réaction montre qu'une fraction (fraction I) de l'ADPR reste acido-insoluble après les diverses étapes de la purification tandis qu'une autre fraction (fraction II) devient acido-soluble après que les protéines aient été hydrolysées.

L'ensemble de nos déterminations démontre avec certitude que la fraction I est un polyADPR dans lequel les unités ADPR sont liées les unes aux autres par liaison osidique entre le C_1, porteur de la fraction semi-acétalique d'une molécule d'ADPR, et le C_2 porteur d'une fonction alcool secondaire de la fraction AMP de la molécule d'ADPR adjacente.

Cette structure et celle du nucléotide Ψ ADPR, produit principal de l'hydrolyse pyrophosphatasique du polyADPR, ont été confirmées par deux groupes de chercheurs japonais[59,60] qui n'ont toutefois pas déterminé la position de la fonction

alcool secondaire engagée dans la liaison osidique. Des hydrolyses ménagées nous ont permis d'isoler des oligomères d'ADPR. Les résultats de leur analyse justifient la détermination des longueurs de chaîne du polyADPR par la mesure du rapport ¥ ADPR/5'AMP, après hydrolyse pyrophosphatasique. Nous avons trouvé une longueur de chaîne moyenne d'environ 20, ce qui correspondrait à un poids moléculaire moyen de 11.000, mais il y a une polydispersité assez importante puisque 8 % des molécules ont une longueur de chaîne d'au moins 40. L'hétérogénéité pourrait être due pour une part à la présence dans les extraits nucléaires bruts d'une enzyme capable de dégrader le polyADPR[61]. HAYAISHI et coll. ont trouvé une longueur de chaîne moyenne de 10 pour le polyADPR synthétisé par des extraits nucléaires de foie de rat.

Il y a une certaine discordance entre la longueur de ces chaînes et les coefficients de sédimentation moyens observés puisque nous avons trouvé que le polyADPR sédimente comme le tRNA en gradient de saccharose. HAYAISHI et coll.[59] ont fait une observation analogue, tandis que SUGIMURA et coll.[60] trouvent une valeur d'environ 3 S. Il est évident qu'avant tout essai d'interprétation de ces résultats il faudrait les confirmer par des ultracentrifugations analytiques de polyADPR présentant différentes longueurs de chaîne connues. L'étude de la structure secondaire de polyADPR n'a pas été abordée, si ce n'est par la constatation que l'hydrolyse du polymère se traduit par une certaine hyperchromicité.

La nature de la fraction II correspondant au matériel initialement acido-insoluble et rendue acido-soluble par l'étape de protéolyse lors de la purification du polyADPR reste à élucider. L'acido-insolubilité de l'ADPR ou, éventuellement, d'oligomères d'ADPR avant protéolyse, s'expliquerait par une liaison avec des protéines. Il ne pouvait s'agir d'une simple adsorption d'ADPR sur des protéines nucléaires acido-insolubles puisque nous avons montré que l'ADPR ajouté au milieu d'incubation reste acido-soluble. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'une liaison covalentielle puisque,nous l'avons vu, elle résiste à l'électrodialyse et au traitement par l'urée 8 M.

Cette liaison covalentielle pourrait s'établir entre l'enzyme et l'ADPR dans un complexe correspondant à une étape intermédiaire de la réaction. Mais, étant donné l'activité spécifique de l'enzyme, dans l'extrait nucléaire brut, un calcul simple montre que cette hypothèse n'est pas vraisemblable. Dans une note préliminaire HAYAISHI et coll.[62] ont récemment montré qu'après incubation de noyaux de foie de rat en présence de DPN, environ 75 % de l'ADPR acido-insoluble pourraient être extraits avec les histones. Il s'agirait de molécules d'ADPR liées à ces protéines par une liaison covalentielle non encore définie. Au vu de ces résultats, HAYAISHI et coll. proposent que la fraction ADPR du DPN soit transférée sur des histones, puis que par transferts successifs d'unités d'ADPR, il y ait formation et élongation du polyADPR qui resterait lié aux histones. Ces résultats rendent compte de nos observations et il se pourrait donc que cette fraction II corresponde à des

molécules d'ADPR qui avant la protéolyse étaient liées à des histones et qui resteraient liées à des oligopeptides après la protéolyse. Nous avons en effet vérifié qu'il ne s'agit pas d'ADPR libre.

L'hypothèse d'HAYAISHI[62] relative au mode de polymérisation de l'ADPR pourrait également expliquer que nous n'avons pas réussi à obtenir du polyADPR totalement dépourvu d'acides aminés puisque le polyADPR serait covalentiellement lié aux histones et que, même après protéolyse poussée, un oligopeptide pourrait rester covalentiellement lié au polyADPR. Des études ultérieures nous montreront si ces acides aminés sont liés au polyADPR par la liaison covalentielle postulée par HAYAISHI.

2 - PROPRIETES DE LA POLYADPR SYNTHETASE.

L'enzyme peut être considérée comme une DPNase puisque la nicotinamide est libérée au cours de la réaction. Mais cette DPNase se distingue de la DPNase microsomique par sa localisation et par un certain nombre de propriétés, en particulier par l'aptitude à transférer les groupements ADPR du DPN pour les polymériser.

Les propriétés de l'enzyme dans des extraits nucléaires bruts ont été étudiées par les deux groupes japonais qui s'intéressaient à la structure du polyADPR[55,56] et par deux groupes allemands[57,58] qui étudiaient systématiquement la répartition intracellulaire des DPNases. Aucun de ces groupes n'a jusqu'à présent publié de résultat concernant les propriétés d'une enzyme purifiée ou partiellement purifiée.

Nos résultats ainsi que ceux des groupes de HAYAISHI[55] et SUGIMURA[56] suggèrent que l'enzyme n'est présente que chez les animaux. Il faut toutefois noter que si un grand nombre de bactéries ont été testées[56], aucun essai n'a été effectué chez les plantes et qu'il y a une indication indirecte de la présence de l'enzyme dans la levure[60]. Nous y reviendrons. Nos observations et celles des autres groupes[55,56], indiquent que l'enzyme est présente dans divers organes et que le foie possède l'activité la plus élevée.

Nos résultats concernant la localisation nucléaire de l'enzyme ont été confirmés[55,56,57,58]. HAYAISHI et coll.[64] ont observé comme nous que l'enzyme est principalement liée à la fraction insoluble chromatinienne du noyau, mais nous n'avons pas trouvé la localisation nucléolaire préférentielle qui avait été rapportée par HILZ et coll.[57,63], puis contestée par BOCK et coll.[58].

Une des propriétés remarquables de la polyADPR synthétase est son inactivation par traitement de l'extrait nucléaire avec la DNase. Cette observation a été confirmée par HAYASHI et coll.[55] et par BOCK et coll.[58], tandis que pour une raison inconnue, SUGIMURA et coll.[56] n'observaient aucune diminution d'activité après action de la DNase. Il ne semble pas que le DNA ait un effet très spécifique puisque, nous l'avons vu, l'addition d'autres polyanions (PES par exemple) peuvent restaurer une certaine activité alors que ces polyanions sont sans effet lorsqu'il n'y a pas eu de prétraîtement par la DNase. Nous reviendrons plus loin sur le rôle possible du DNA et des polyanions dans la réaction.

La purification de la polyADPR synthétase s'est révélée fort difficile car d'une part l'enzyme est très fortement liée au DNA et d'autre part elle semble perdre une partie importante de son activité lorsqu'elle est séparée du DNA. Signalons, pour illustrer les diffucltés à séparer l'enzyme du DNA, les expériences de HAYAISHI et coll.[54] qui n'ont pas réussi à les séparer ni sur colonnes de Sephadex G 200 équilibrée avec du sulfate d'ammonium 1,7 M, ni par ultracentrifugation en gradient de densité de sulfate de césium. Il est possible de stimuler l'enzyme partiellement purifiée et débarrassée du DNA par d'autres polyanions, mais ceci introduit une difficulté pour apprécier le degré de purification de l'enzyme car on ne dispose d'aucune base de comparaison pour savoir quelle est la valeur de la stimulation obtenue par rapport à celle donnée par le DNA dans l'extrait nucléaire initial, d'autant que le DNA lui même ne stimule pas l'enzyme purifiée! D'autre part le test adopté pour mesurer l'activité enzymatique est fondé sur l'acido-insolubilité du produit radioactif de la réaction. Nous verrons que ce test n'est pas idéal non plus, car il semble qu'au cours de la purification l'enzyme perde la propriété de polymériser l'ADPR et livre de l'ADPR sous forme libre. Malheureusement les activités mesurées ne sont pas assez élévées pour que l'on puisse doser en routine le DPN consommé.

Ces quelques exemples soulignent qu'il faut regarder avec circonspection les tableaux concernant la purification de l'enzyme et ne pas attacher trop d'importance aux chiffres, particulièrement à ceux concernant le rendement et le degré de

purifications. Il est très possible que ces chiffres soient inférieurs d'au moins trois fois à la réalité.

Nous avons étudié certaines propriétés de l'enzyme partiellement purifiée et nous pouvons les comparer à celles rapportées pour l'enzyme nucléaire brute. Le pH optimum est situé entre pH 7,5 et 8,5 en présence de PES, valeur du même ordre que celles de pH 8,2 [57], pH 7,5 [58], pH 8,0 [56] données pour les extraits nucléaires bruts. A pH 10 l'activité est nulle. En absence de PES la courbe d'activité en fonction du pH présente un optimum à partir de pH 8,0 et reste en plateau jusqu'à pH 10. Ces différences suggèrent que le PES agit en se liant à l'enzyme qui, nous le savons, est fortement basique.

L'enzyme partiellement purifiée est stimulée par les cations divalents et en particulier Mg^{++}. L'optimum est en accord avec les valeurs trouvées par HAYAISHI et coll. [55] pour l'enzyme brute, Au contraire, SUGIMURA et coll. [50] n'observent pas de stimulation par Mg^{++}, ni Mn^{++}, mais une très forte stimulation par Ca^{++}. Nous n'avons pas d'explication à ce désaccord.

La stimulation observée par addition de β-mercaptoéthanol au milieu d'incubation est en accord avec l'inhibition provoquée par l'addition de métaux lourds et avec celle rapportée par SUGIMURA et coll. pour l'enzyme brute par le PCMB. Les Km pour le DPN en absence et en présence de PES sont de l'ordre de 2×10^{-4} M et 9×10^{-5}M. Il se pourrait donc qu'une partie de la stimulation observée par addition de PES soit due à une modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ces valeurs sont à comparer avec celles données par les auteurs

allemands pour l'enzyme nucléaire brute : $2,7 \times 10^{-4}$ M[57] et 6×10^{-4}M [58]. La réaction catalysée par l'enzyme partiellement purifiée est inhibée par la nicotinamide comme celle catalysée par l'extrait enzymatique brut[55,56,57,58]. Nous avons trouvé des Ki de l'ordre de $1,2 \times 10^{-3}$ M en l'absence de PES et de $2,5 \times 10^{-3}$M en présence de PES. L'inhibition semble être de type mixte contrairement aux observations faites avec des extraits enzymatiques bruts[57,58] qui concluaient à une inhibition compétitive caractérisée par des Ki de 5×10^{-5} M[57] et 2×10^{-4} M[58]. Soulignons qu'il faut se garder d'attacher trop d'importance à nos valeurs de Km et de Ki puisque le test mesurant l'activité de l'enzyme est criticable comme nous l'avons expliqué plus haut.

Nos essais indiquent que dans nos conditions expérimentales l'enzyme partiellement purifiée n'est pas capable de catalyser la réaction en sens inverse c'est-à-dire de permettre la synthèse de DPN à partir de polyADPR en présence d'un excès de nicotinamide. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par HAYAISHI et coll.[55] montrant que l'addition de nicotinamide à l'extrait nucléaire brut n'accélère pas la dégradation de polyADPR.

L'ensemble de ces propriétés distingue clairement la DPNase microsomique de la DPNase-polyADPR synthétase nucléaire. En effet, la 1ère n'est pas capable de rendre l'ADPR acido-insoluble[55,57,58], son pH optimum est d'environ 6[57,58], elle n'est pas spécifique du DPN, alors que l'enzyme nucléaire agit spécifiquement sur le DPN[58], elle est inhibée par la nicotinamide,

mais aussi par l'hydrazide de l'acide isonicotinique alors que l'enzyme nucléaire ne l'est pas[56,57], et enfin, contrairement à l'enzyme nucléaire, elle catalyse l'échange de la nicotinamide du DPN avec la nicotinamide ou ses analogues structuraux[67,68,69,70,71]. L'enzyme partiellement purifiée perd dès la première étape de purification (colonne d'hydroxylapatite) la propriété de polymériser l'ADPR en chaînes suffisamment longues pour être acido-insolubles par elles-mêmes. Nous avons en effet observé que la transformation par l'enzyme partiellement purifiée de la fraction ADPR du DPN en un produit acido-insoluble était à mettre sur le compte d'une liaison avec des protéines, puisqu'un traitement protéolytique libère la radioactivité de l'ADPR sous forme acido-soluble. D'autre part, nous avons soumis récemment le produit de la réaction à une hydrolyse pyrophosphatasique et nous avons trouvé du 5'AMP dans les produits d'hydrolyse et très peu de ΨADPR ce qui indique que la majeure partie de l'ADPR acido-insoluble est sous forme de simples unités et qu'il n'y a pratiquement pas de dimères ou d'oligomères supérieurs.

Tout se passe donc comme si l'enzyme partiellement purifiée ne pouvait plus catalyser que la réaction qui dans l'extrait nucléaire brut amène la formation de ce que nous avons appelé plus haut la fraction II. Nous avons également observé que de l'ADPR libre apparaissait au cours de la réaction catalysée par l'enzyme partiellement purifiée.

Deux questions se posent : d'une part, quelles sont les protéines qui rendent l'ADPR acido-insoluble et quelle est la

nature de la liaison entre l'ADPR et ces protéines, d'autre part, pourquoi l'enzyme partiellement purifiée perd-elle la propriété de fabriquer du polyADPR?

De nouvelles expériences seront nécessaires pour répondre à ces questions. Toutefois en ce qui concerne la première question les récents résultats de HAYAISHI et coll.[62] que nous avons déjà discutés plus haut permettent d'avancer une hypothèse de travail : l'enzyme transférerait et lierait par liaison covalentielle l'ADPR du DPN à des histones, mais ne serait plus capable de transférer de nouvelles molécules d'ADPR sur l'ADPR déjà lié aux histones pour fabriquer du polyADPR. D'autre part, l'enzyme transférerait également une partie de l'ADPR du DPN à l'eau puisque nous avons trouvé de l'ADPR libre dans les produits de la réaction et que celui-ci ne peut être le produit d'une enzyme contaminante,ainsi que nous l'avons discuté dans le chapître "Résultats". A cet égard il est intéressant de remarquer que l'addition d'histones au milieu d'incubation n'augmente pas la formation d'ADPR acido-insoluble ainsi que nous l'avons rapporté dans les expériences de cinétiques.

On peut avancer un certain nombre d'hypothèses pour tenter d'expliquer la perte par l'enzyme partiellement purifiée de la capacité à synthétiser du polyADPR. Nos observations permettent d'en rejeter certaines. En particulier, il ne semble pas qu'il manque une amorce de polyADPR puisque l'addition de celui-ci est sans effet ; il ne semble pas non plus que l'on ait perdu une deuxième enzyme qui transférerait l'ADPR puisque nous savons que l'ADPR libre n'est pas incorporé lorsqu'on l'ajoute au

milieu d'incubation. Bien que la perte de la capacité à synthétiser du polyADPR coïncide avec la séparation de l'enzyme du DNA, il ne paraît pas que le DNA à lui seul puisse restituer cette faculté puisque nous avons montré que son addition au milieu d'incubation est sans effet, de même d'ailleurs que celle d'autres polyanions (PES) qui pourtant stimulent l'enzyme. Mais il y a d'autres hypothèses qu'il ne nous est pas possible de confirmer ou d'infirmer actuellement : il se pourrait que l'enzyme possède différents sites et que celui correspondant au transfert de l'ADPR pour permettre la synthèse de polyADPR soit modifié durant la purification ; on pourrait aussi invoquer la perte d'un accepteur différant du polyADPR et qui seul permettrait la synthèse de polyADPR à chaînes longues. Il est enfin possible que le complexe nucléaire initial ait une géométrie optimale pour la synthèse du polyADPR et que celle-ci ne puisse être reconstituée ni par l'addition de DNA purifié, ni par celle d'histones. A cet égard il est intéressant de rappeler que l'addition de DNase à l'enzyme brute provoque une très importante diminution de l'activité enzymatique et selon HAYAISHI et coll.[62] une réduction de la longueur des chaînes du polyADPR synthétisé. Le DNA jouerait donc un rôle relativement spécifique dans la réaction de polymérisation, puisque si certains polyanions peuvent stimuler l'enzyme, il ne semble pas qu'ils puissent remplacer le DNA dans son rôle favorisant l'élongation des chaînes de polyADPR.

On peut, en tenant compte des résultats récents d'HAYAISHI et coll.[62] et des nôtres, proposer le mécanisme enzymatique

suivant pour la synthèse du polyADPR.

(1) DPN + histones $\xrightarrow[\text{ou polyanions}]{\text{DNA}}$ histones - ADPR + nicotinamide.

(2) histones - ADPR + DPN $\xrightarrow{\text{DNA}}$ histones - ADPR(2) + nicotinamide.

(3) histones - $ADPR_2$ + DPN $\xrightarrow{\text{DNA}}$ histones ADPR(3) + nicotinamide.

etc.

Il est très possible que la réaction (1) se fasse en deux étapes, l'une correspondant à la formation d'un complexe intermédiaire ADPR-enzyme selon le schéma :

DPN + enzyme ⟶ ADPR - enzyme + nicotinamide.

Mais, si cette étape existe, elle n'est pas réversible puisque nous n'avons pas observé d'incorporation de nicotinamide radioactive dans le DPN lorsqu'un excès de nicotinamide marquée a été ajouté au milieu d'incubation.

Il est intéressant de noter qu'HAYAISHI et coll.[65] ont récemment décrit le transfert de l'ADPR du DPN sur l'aminoacyltransférase II purifiée de foie de rat en présence de toxine diphtérique. L'ADPR reste lié par liaison covalentielle à la transférase II et cette liaison provoque l'inactivition de cette enzyme. La toxine diphtérique agirait dans cette réaction soit comme une enzyme, soit comme un cofacteur. Il y a donc là un deuxième exemple de transfert d'ADPR du DPN sur une protéine avec formation d'une liaison covalentielle mais contrairement à ce que l'on a observé pour la polyADPR synthétase, la réaction est parfaitement réversible en présence de nicotinamide.

3 - PRESENCE DU POLYADPR IN VIVO ET ROLE BIOLOGIQUE.

Nos résultats indiquent qu'on peut mettre en évidence du polyADPR dans les noyaux de foie de poulet au moins dans les conditions où la synthèse du DPN est stimulée. Nous n'avons pas recherché la présence de polyADPR dans les noyaux de foie de poulet non traité par la nicotinamide par raison d'économie, mais il n'est pas certain que l'injection de nicotinamide pour stimuler la synthèse du DPN soit la meilleure façon d'augmenter les chances de trouver du polyADPR puisque, nous l'avons vu, la polyADPR synthétase est inhibée par l· nicotinamide.

On peut, d'après nos résultats, estimer que dans l'une des expériences nous avions environ 15 µmoles de polyADPR et dans l'autre environ 4 µmoles de polyADPR (en supposant que l'activité spécifique des phosphates du polyADPR soit identique à celle des phosphates des nucléosides monophosphates cellulaires). Il y aurait donc dans nos conditions expérimentales au maximum 15mµmoles de polyADPR par gramme de foie, c'est-à-dire environ 8 µg alors qu'il y a environ 2 mg de DNA/ g de foie. En tout état de cause il s'agit donc d'un constituant présent à un taux très faible, ce qui explique qu'il n'ait pas été décrit jusqu'à présent comme un contaminant des acides nucléiques dans les tissus animaux.

L'étude systématique de la répartition de l'enzyme dans le monde vivant n'a pas été faite. Toutefois il ne semble pas que l'enzyme soit présent dans les bactéries. Il y a cependant une observation qui pourrait indiquer que le polyADPR existe dans la levure. En effet, HALL[66] a trouvé du ribosyl-adénosine parmi

les constituants d'un hydrolysat de tRNA par le venin de serpent et la phosphatase alcaline. Ce composé est celui que l'on attend d'une telle hydrolyse du polyADPR. Il n'est donc pas impossible que la levure contienne du polyADPR, d'autant que SUGIMURA et coll.[60] auraient isolé du polyADPR marqué à partir de levure poussant dans un milieu contenant du phosphate radioactif.

Quel pourrait être le rôle biologique du polyADPR? La réaction étant inversible, il ne semble pas qu'il puisse s'agir d'une forme de réserve du DPN. Il pourrait éventuellement intervenir dans la régulation du taux de DPN intracellulaire; à ce propos il est intéressant que la polyADPR synthétase se trouve localisée dans la fraction chromatinienne du noyau comme la DPN pyrophosphorylase qui assure la synthèse du DPN. La liaison de l'ADPR,et peut être aussi du polyADPR,aux histones soulève enfin la possibilité d'un rôle de cette réaction de transfert dans la régulation de l'expression génétique pour autant que les histones y participent !

En conclusion, si la structure primaire du polyADPR est bien établie, le mécanisme de sa synthèse est loin de l'être et on ne sait rien sur son rôle biologique éventuel.

CONCLUSION ET RESUME

En 1963, CHAMBON et coll. observèrent que l'addition de NMN (nicotinamide mononucléotide) à un milieu d'incubation destiné à mesurer l'activité de la RNA polymérase agrégée de noyaux de foie de rat ou de poulet provoquait une stimulation très importante de l'incorporation de la radioactivité du $[\alpha\text{-}P^{32}]$ ou $[C^{14}]$ATP dans un produit acido-insoluble et cela même en l'absence des autres nucléosides triphosphates. Une identification préliminaire avait suggéré que ce produit acido-insoluble pourrait être du polyadénylate. En 1964, nous décidâmes d'entreprendre des recherches sur ce composé acido-insoluble pour en déterminer la structure et étudier les modalités de sa biosynthèse.

Nous avons d'abord constaté à l'aide de molécules marquées que les extraits nucléaires de foie de poulet catalysent l'incorporation dans le produit acido-insoluble de la moitié adénylique de l'ATP, de même que le ribose et le phosphate du NMN, alors que la nicotinamide n'est pas incorporée. Ces résultats nous ont suggéré que le DPN pourrait être le précurseur direct du polymère acido-insoluble, ce que nous avons démontré à l'aide de DPN marqué dont la fraction adénosine diphosphate ribose (ADPR) est incorporée alors que la nicotinamide ne l'est pas. Toutefois, l'ADPR libre n'est pas un intermédiaire, car

l'addition d'ADPR froid au milieu d'incubation ne réduit pas l'incorporation de la radioactivité du $[P^{32}]$DPN et le $[P^{32}]$ADPR n'est pas incorporé.

Afin de démontrer que l'acido-insolubilité du produit de la réaction est due à une polymérisation de molécule d'ADPR et non à une liaison éventuelle de résidus ADPR à d'autres macromolécules elles-mêmes acido-insolubles, nous avons procédé après incubation à des traitements par des enzymes nucléolytiques et protéolytiques ; environ 50 % de la radioactivité demeurent acido-insolubles après ces traitements. Ces constatations nous indiquaient une voie possible pour purifier le produit de la réaction.

La méthode de purification du polyADPR est fondée sur sa résistance aux enzymes nucléolytiques qui nous ont permis de nous débarrasser des acides nucléiques. Pour éliminer les protéines, deux méthodes sont utilisées : soit une protéolyse, soit des extractions répétées au phénol. La purification poussée du polyADPR met à profit son insolubilité sous forme de sels de magnésium et le fait qu'il soit précipitable par l'éthanol à 50 %. Le polyADPR ainsi purifié se présente sous forme d'une poudre blanche. Il est exclu par les Sephadex G 25 et G 50 et il sédimente en gradient de saccharose comme les RNA de transfert, son spectre d'absorption dans l'ultra-violet est semblable à celui de l'ADPR. Il n'est ni dialysable, ni électrodialysable ; en chromatographie sur DEAE cellulose, en présence

d'urée 8 M, il est élué par des concentrations de carbonate de triéthylamine comprises entre 0,3 M et 0,8 M.

L'analyse des constituants du produit purifié par protéolyse ou extraction au phénol indique une constitution identique à celle de l'ADPR avec une molécule d'adénine pour deux molécules de ribose et deux molécules de phosphate.

La structure primaire du polyADPR a été déterminée grâce à des hydrolyses spécifiques. L'hydrolyse du polyADPR par la pyrophosphatase du venin de serpent livre pour 88 % un isomère de l'ADPR, que nous avons appelé pseudo -ADPR (ΨADPR), et 6 % de 5'AMP. L'analyse chimique du ΨADPR montre une composition analogue à celle de l'ADPR, soit : 2 atomes de phosphore pour 2 molécules de ribose et 1 molécule d'adénine. Il diffère toutefois de l'ADPR par un certain nombre de propriétés :

- il n'est pas hydrolysable par la pyrophosphatase du venin de serpent.

- il ne possède pas de pouvoir réducteur contrairement à l'ADPR. Toutefois après hydrolyse acide douce, le pouvoir réducteur apparaît.

- il ne consomme qu'une molécule de métapériodate par molécule d'adénine alors que l'ADPR authentique en consomme 3. Toutefois, après hydrolyse acide, la consommation de métapériodate s'élève à 3 molécules par mole d'adénine.

L'hydrolyse de ΨADPR par la phosphatase alcaline intestinale libère un composé contenant 2 molécules de ribose pour

1 molécule d'adénine et correspondant donc à un ribosyladénosine. D'autre part, le fractionnement des produits d'hydrolyse acide douce du ΨADPR permet d'isoler du 5'AMP et du ribose-5-phosphate. L'ensemble de ces données nous ont suggéré que le ΨADPR est formé de 2 fractions : ribose-5-phosphate et 5'AMP liées par une liaison osidique entre les C'_2 ou C'_3 du 5'AMP et le C'_1 porteur de la liaison semi-acétalique du ribose-5-phosphate.

Par méthylation du ribosyladénine provenant du ΨADPR, nous avons pu établir la positiion de la liaison osidique contenue dans le ΨADPR : elle se fait entre la fonction alcool secondaire portée par le C'_2 du 5'AMP et la fonction semi-acétalique portée par le C'_1 du ribose-5-phosphate. Le ΨADPR étant le produit de l'hydrolyse pyrophosphatasique du polyADPR, on pouvait par conséquent proposer pour celui-ci la structure primaire représentée dans le schéma ci-contre.

Si la structure proposée est exacte et étant donné la labilité de la liaison osidique en milieu acide dilué, l'hydrolyse acide douce du "polyADPR" devrait livrer essentiellement de l'ADPR. Effectivement, le polyADPR soumis à une hydrolyse acide douce fournit un composé dont la migration chromatographique et les caractéristiques analytiques sont celles de l'ADPR authentique. D'autre part, après hydrolyse acide partielle du polyADPR et chromatographie sur DEAE cellulose, nous obtenons des oligomères d'ADPR tandis que l'hydrolyse pyrophosphatasique partielle livre très vraisemblablement des oligomères de ΨADPR. L'isolement de ces composés confirme donc la

structure primaire proposée pour le polyADPR. Enfin, l'étude du rapport ΨADPR/5'AMP dans les hydrolysats pyrophosphatasiques du polyADPR purifié sur colonne de DEAE cellulose nous indique que dans la préparation analysée 80 % du polyADPR possèdent une longueur de chaîne moyenne égale à 17 tandis que 8 % des molécules ont une longueur de chaîne moyenne d'environ 40.

L'ensemble de ces résultats démontre donc sans ambiguité que le polyADPR est formé par polymérisation de molécules d'ADPR liées les unes aux autres par liaison osidique entre le C'_1 porteur de la fonction semi-acétalique d'une molécule d'ADPR et le C'_2 porteur d'une fonction alcool secondaire de la fraction adénylique de la molécule d'ADPR adjacente.

Il était évidemment intéressant de rechercher la présence de ce polymère in vivo. Dans ce but, nous avons opéré sur des poulets dont la synthèse hépatique de DPN fut stimulée par injection de nicotinamide. Pour marquer le polyADPR qui pouvait éventuellement se former, nous avons injecté du $^{32}PO_4H_3$. Nous avons préparé les noyaux de foie des animaux ainsi traités et utilisé la technique qui nous avait permis de purifier le polyADPR synthétisé in vitro. Après addition de polyADPR froid comme entraîneur, nous avons obtenu un produit radioactif Mg^{++} et alcoolo-précipitable dont les caractéristiques analytiques correspondent à celles que nous avions établies pour le polyADPR synthétisé in vitro.

1) la chromatographie des produits d'hydrolyse pyrophosphatasique a permis d'identifier du 5'AMP^{32} et un spot radioactif migrant légèrement plus loin que l'ADPR témoin. Les rapports moléculaires donnés par analyse du spot ayant un R_f voisin de l'ADPR sont de : 1 molécule d'adénine pour 2 molécules de ribose et 2 molécules d'orthophosphate. De plus, l'hydrolyse acide ménagée livre du ribose-5-phosphate et du 5'AMP marqués par le P^{32}. La radioactivité est donc bien assodiée au ¥ ADPR que nous avions identifié comme étant le produit essentiel de l'hydrolyse pyrophosphatasique du polyADPR synthétisé in vitro.

2) l'hydrolyse acide douce du polymère radioactif libère du 5'AMP, de l'ADPR authentique et du ribose-5-phosphate radioactifs, ce qui est également conforme à la structure du polyADPR.

Ainsi, la radioactivité est effectivement localisée dans les molécules résultant de la dégradation spécifique du polyADPR. Sur la base de ces données, nous démontrons donc que ce polymère peut être synthétisé in vivo, dans les noyaux de foie de poulet, dans des conditions où la synthèse du DPN est stimulée.

La synthèse du polyADPR pouvant se faire soit à partir d'ATP et de NMN, soit à partir de DPN, nos extraits nucléaires devaient contenir, d'une part, la NMN adénylyltransférase synthétisant le DPN à partir d'ATP et de NMN et qui est localisée dans les noyaux de cellules animales et, d'autre part, l'enzyme qui polymérise le DPN en polyADPR et que nous avons appelé

polyADPR synthétase. Pour prouver que nos extraits nucléaires contiennent ces deux fractions enzymatiques, nous avons essayé de les purifier. Nous avons séparé une fraction qui ne peut utiliser que le DPN comme substrat et qui correspond donc à l'activité polyADPR synthétasique et une autre fraction qui, à partir d'ATP et de NMN, synthétise du DPN et qui correspond donc à la NMN adénylyltransférase.

La polyADPR synthétase a été purifiée environ 16 fois avec un faible rendement de l'ordre de 2 %. Nous avons essayé sans succès de purifier l'enzyme par un grand nombre d'autres méthodes pour améliorer le rendement. Cette préparation enzymatique partiellement purifiée, ne contenant pas d'autres enzymes utilisant le DPN comme substrat, nous a néanmoins permis d'étudier certaines des propriétés de la réaction.

L'activité de l'enzyme débarrassée du DNA est stimulée par certains polyanions naturels ou synthétiques ; c'est ainsi que le polyéthylène sulfonate (PES) provoque une stimulation de l'ordre de 15 à 20 fois. Nous avons également montré qu'il y a une nette différence entre les courbes de pH établies en l'absence et en présence de PES. La réaction est stimulée par certains cations divalents et par les groupements SH. La cinétique de la réaction a été déterminée à 20°, 27° et 37°, en l'absence et en présence de PES. A 37°, la vitesse initiale de la réaction décroît très rapidement, tandis qu'à 20°, elles est constante durant environ 20 min.

En présence de PES, le Km pour le DPN est environ 2 fois plus faible qu'en son absence, ce qui suggère qu'un changement

dans l'affinité de l'enzyme pour le DPN pourrait expliquer, au moins pour une part, la stimulation liée à l'addition de polyanions.

La présence de nicotinamide dans le milieu d'incubation provoque une inhibition de la réaction, c'est-à-dire la synthèse de DPN à partir de polyADPR et de nicotinamide présente un grand intérêt en relation avec le rôle physiologique possible de l'enzyme. En effet, si la réaction était aisément réversible, on pourrait envisager.que le polyADPR soit une forme de réserve de DPN dans les cellules. Le rôle inhibiteur de la nicotinamide sur la synthèse du polyADPR nous incitait également à étudier les conditions d'une possible réversibilité de la réaction. A cet égard, nous avons réalisé deux types d'expériences : d'une part, nous avons incubé de l'enzyme en présence de polyADPR radioactif et de nicotinamide et suivi la radioactivité restant acido-insoluble. D'autre part, nous avons incubé l'enzyme en présence de DPN non radioactif et de nicotinamide radioactive puis isolé le DPN pour déterminer son marquage éventuel. Nos résultats indiquent que la réaction n'est pas réversible, au moins dans les conditions expérimentales que nous avons choisies.

Nous avons essayé de purifier et d'isoler le produit acido-insoluble de la réaction catalysée par l'enzyme partiellement purifiée, en utilisant la méthode qui nous avait permis de purifier le polyADPR synthétisé à l'aide d'extraits nucléaires bruts. Il semble que l'enzyme partiellement purifiée ait perdu la capacité de polymériser l'ADPR du DPN en des chaînes suffisamment longues pour être acido-insolubles en l'absence des

protéines présentes dans notre préparation. Il est donc très probable qu'au cours de la purification, certains facteurs nécessaires pour synthétiser du polyADPR à longue chaîne aient été perdus ou bien que l'enzyme ait été altérée. Il ne semble pas que les facteurs manquants puissent être soit une amorce de polyADPR, soit du DNA, car leurs additions n'ont pas d'effet.

En résumé, nous avons :

- démontré l'existence d'un système enzymatique nucléaire synthétisant un nouveau polymère polynucléotidique, le polyADPR, dont nous avons établi sans ambiguité la structure primaire.
- démontré la possibilité de la présence de ce polymère in vivo.
- purifié partiellement l'enzyme qui catalyse la réaction.
- montré au'il s'agit d'une enzyme distincte de la NMN adénylyltransférase et étudié certaines de ses caractéristiques.

A B R E V I A T I O N S

DNA	: acide désoxyribonucléique.
RNA	: acide ribonucléique.
DPN	: diphosphopyridine nucléotide.
DPNH	: diphosphopyridine nucléotide réduit.
TPN	: triphosphopyridine nucléotide.
TPNH	: triphosphopyridine nucléotide réduit.
NMN	: nicotinamide mononucléotide.
Nam	: nicotinamide.
AMP	: adénosine monophosphate.
ADP	: adénosine diphosphate.
ATP	: adénosine triphosphate.
CMP	: cytosine monophosphate.
GMP	: guanosine monophosphate.
R_5P	: ribose-5-phosphate.
ADPR	: adénosine-diphospho-ribose.
ΨADPR	: pseudo adénosine-diphospho-ribose.
PolyU	: acide polyuridylique.
DNase	: désoxyribonucléase.
RNase	: ribonucléase.
DPNase	: diphosphopyridinenucléotidase.
M	: molaire.
mM, µM	: milli, micromolaire.
µC	: microcurie.
mg	: milligramme.

ml : millilitre.

mA : milliampère.

g : accélération due à la pesanteur.

R_f : rapport de migration du composé au front du solvant.

D.O. : densité optique.

IO_4K : périodate de potassium.

$CaCl_2$: chlorure de calcium.

NaCl : chlorure de sodium.

KCl : chlorure de potassium.

KOH : potasse.

NaOH : soude.

NH_4OH : ammoniaque.

HCl : acide chlorhydrique.

$HClO_4$: acide perchlorique.

$PO_4^{\equiv}$: phosphate.

PO_4HNa_2 : phosphate disodique.

PO_4H_3 : acide phosphorique.

HCO_3Na : carbonate de sodium.

TCA : acide trichloracétique.

H_2SO_4 : acide sulfurique.

$MgSO_4$: sulfate de magnésium.

$MgCl_2$: chlorure de magnésium.

KCN : cyanure de potassium.

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (THAM).

EDTA : éthylène-diamine-tétraacétate.

B.A.L. : Brithish Anti Lewisit.

SDS : dodécylsulfate de sodium.

PES : polyéthylène sulfonate.

B I B L I O G R A P H I E

1. REVEL, M. et MANDEL, P. - Cancer Res., 22, 456 (1962).
2. BUSCH, S., CHAMBON, P., MANDEL, P. et WEILL, J.D. - Bioche Biophys. Res. Communs.,7, 255 (1962).
3. WEILL, J.D., BUSCH, S., CHAMBON, P. et MANDEL, P. - Bioche Biophys. Res. Communs., 10, 122 (1963).
4. KAPLAN, N.O., GOLDIN, A., HUMPHUY, S.R., CIOTTI, M.M. et STOLZENBACH, F.E. - J. Biol. Chem., 219, 287 (1956).
5. WEILL, J.D. - Thèse d'Etat de Doctorat ès-Sciences, Strasbourg, 1958, 176 pages imprimées.
6. COLOWICK, P.S., KAPLAN, N.O. et CIOTTI, M.M. - J. Biol. Chem., 191, 447 (1951).
7. CIOTTI, M.M. et KAPLAN, N.O. - in Methods in Enzymology, Publ. Acad. Press, New York, vol. III, 890 (1957).
8. KORNBERG, A. - J. Biol. Chem., 182, 779 (1950).
9. ZATMAN, L.J., KAPLAN, N.O. et COLOWICK, S.P. - J. Biol. Chem., 200, 197 (1953).
10. TENER, G.M. - J. Am. Chem. Soc., 83, 159 (1961).
11. CANNELAKIS, E.S., GOTTESMAN, M.E. et KAMMEN, H.O. - Biochim. Biophys. Acta, 39, 82 (1966).
12. LOWRY, O.H., ROBERTS, N.R. et KAPPHAHN, J.I. -J. Biol. Chem., 224, 1047 (1957).
13. KAPLAN, N.O., COLLOWICK, S.P. et BARNES, C.C. - J. Biol. Chem., 192, 461 (1951).
14. SIEGEL, J.M., MONTGOMERY, G.A. et BOCK, R.M. - Arch. Biochem. Biophys., 82, 288 (1959).

15. BRIGGS, A.P. - J. Biol. Chem., 53, 13 (1922).

16. MACHEBOEUF, M. et DELSAL, J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 25, 116 (1943).

17. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. et WARNER, H. - Analyt. Chem., 28, 1756 (1956).

18. DISCHE, Z. - Mikrochemie, 2, 4 (1930).

19. BURTON, K. - Biochem. J., 62, 315 (1956).

20. MEJBAUM, W.Z. - Physiol. Chem., 258, 117 (1937).

21. MEJBAUM, W. - Biokhimiya, 10, 353 (1945).

22. PARK, J.T. et MARVIN, J.J. - J. Biol. Chem., 181, 149 (1949).

23. DIXON, J.S. et LIPKIN, D. - Analyt. Chem., 26, 1092 (1954)

24. NESSLER, H. - Analyt. Chem., 7, 415 (1868).

25. PARNAS, J.K. et WAGNER, R. - Biochem. Z., 125, 25 (1921).

26. GORNALL, A.G., BARDA WILL C.J. et DAVID, M.M. - J. Biol. Chem., 177, 751 (1949).

27. COLOWICK, S.P. et KAPLAN, N.O. - in Methods in Enzymology, Publ. [illegible]ic Press, New York, vol. III, 702 (1957).

28. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

29. Circulaire PABST, n° OR 10 (1956) et OR 18 (1961).

30. CHIRGWIN, E., MACSWIK, P. [illegible]ER, R., VISCHER, E. - [illegible], Chem. Soc. 71, 1513 (1949).

31. MARKHAM, R. et SMITH, J.D. - Biochem. J., 49, 401 (1951).

32. PETEK, F. et TO DONG - Enzymologia, 23, 133 (1961).

33. GROSS, D. et ALBON, N. - Analyst, 78, 191 (1953).

34. DOLY, J. et PETEK, F. - C.R. Acad. Sc. Paris, 263, 1341 (1966).

35. HANES, C.S. et ISHERWOOD, F.A. - Nature, 164, 1107 (1949).

36. PETEK, F. - Thèse de Doctorat en Pharmacie, Paris 1961.

37. PETEK, F. - Bull. Soc. Chim. Fr., 263 (1965).

38. CHAMBON, P. et MANDEL, P. - Bull. Soc. Chim. Biol., 41, 989 (1959).

39. TISELIUS, A., HJERTEN, S. et LEVIN, C. - Arch. Biochem. Biophys., 65, 132 (1956).

40. LEVIN, C. - in Methods in Enzymology, Ed. Colowick, S.P. et Kaplan, N.O. - Publ. Acad. Press, New York, vol. V, 27 (1962).

41. KUHN, R. et BROSSMER, R. - Berl. Dtsch. Chem. Ges., 92, 1667 (1959).

42. PURDIE, T. et IRVINE, J.C. - J. Chem. Soc., 83, 1024 (1903).

43. CHAUVEAU, J., MOULE, Y. et ROUILLON, C. - Exptl. Cell. Res 11, 317 (1956) et Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 1521 (1957).

44. ZALTA, J.P., ROSENCWAJG, R., CARASSO, N. et FAVARD, P. - C.R. Acad. Sc.Paris, 255, 412 (1962).

45. MURAMATSU, M., SMETANA, K. et BUSCH, H. - Cancer Res., 23, 510 (1963).

46. HOGEBOOM, G.H. et SCHNEIDER, W.C. - J. Biol. Chem., 197, 611 (1952).

47. CAVALIERI, L.F., TINKER, J.F. et BROWN, G.B. - J. Am. Chem Soc., 71, 3973 (1949).

48. MOORE, S. et STEIN, W.H. - J. Biol. Chem., (1948).

49. GREGOIRE, J. et GREGOIRE, J. - Bull. Soc. Chim. Biol. - 43, 121 (1961).

50. ATKINSON, M.R. et MORTON, R.K. - Nature, 188, 58 (1960).

51. ATKINSON, M.R., JACKSON, J.F. et MORTON, R.K. - Biochem. J.- 80, 318 (1961).

52. BERNARDI, G. - Nature, 206, 779 (1965).

53. ALBERTSON, P.A. - in Partition of Cell particles and Macromolecules, Publ. Wiley and Sons, Inc., New York, (1960).

54. CHAMBON, P., WEILL, J.D., DOLY, J., STROSSER, M.T. et MANDEL, P. - Biochem. Biophys. Res. Communs., 25, 638 (1966).

55. NISHIZUKA, Y., UEDA, K., NAKAZAWA, K. et HAYAISHI, O. - J. Biol. Chem., 242, 3164 (1967).

56. FUJIMURA, S., HASEGAWA, S., SHIMIZU, Y. et SUGIMURA, T. - Biochim. Biophys. Acta, 145, 247 (1967).

57. RÖMER, V., LAMBRECHT, J., KITTLER, M. et HILZ, H. - Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 349, 109 (1968).

58. BOCK, K.W., GANG, V., BEER, H.P., KRONAU, R. et GRUNICKE, H. - Europ. J. Biochem., 4, 357 (1968).

59. REEDER, R.H., VEDA, K., HONJO, T., NISHIZUKA, Y. et HAYAISHI, O. - J. Biol. Chem., 242, 3172 (1967).

60. HASEGAWA, S., FUJIMURA, S., SHIMIZU, Y. et SUGIMURA, T. - Biochim. Biophys. Acta, 149, 369 (1967).

61. FUTAI, M., MIZUNO, D. et SUGIMURA, T. - Biochem. Biophys. Res. Communs., 28, 395 (1967).

62. NISHIZUKA, Y., UEDA, K., HONJO, T. et HAYAISHI, O. - J. Biochem., 243, 3765 (1968).

63. LAMBRECHT, J., RÖMER, V. et HILZ, H. - Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 348, 1237 (1967).

64. UEDA, K., REEDER, R.H., HONJO, T., NISHIZUKA, Y. et HAYAISHI, O. - Biochem. Biophys. Res. Communs., 31, 3 (1968).

65. HONJO, T., NISHIZUKA, Y. et HAYAISHI, O. - J. Biochem., 243, 3553 (1968).

66. HALL, R.H. - Biochemistry, 4, 661 (1965).

67. BALLIO, A. et SERULUPI-CRESCENZI, G. - Nature, 180, 1203 (1957).

68. HONJO, T., IKEDA , M., ANDREOLI, A.J., NISHIZUKA, Y. et HAYAISHI, O. - Biochim. Biophys. Acta, 89, 549 (1964).

69. KAPLAN, N.O., CIOTTI, M.M., Van EYS, J. et BURTON, R.M. - J. Biol. Chem., 234, 134 (1959).

70. ALIVISATOS, S.G.A. et WOOLEY, D.W. - J. Am. Chem. Soc. - 77, 1065 (1955).

71. ALIVISATOS, S.G.A. - Nature, 181, 271 (1958).

TABLE DES MATIERES

page :

INTRODUCTION

1ère Partie : MATERIEL ET METHODES

1 - MATERIEL 2

1.1 - Animaux 2

1.2 - Nucléotides radioactifs 2

1.2.1 - [p^{32}-p^{32}]DPN 2

1.2.1.1 - Synthèse biologique 2

1.2.1.2 - Synthèse de [p^{32}]DPN à partir de [α-P^{32}]ATP et de NMN en présence de NMN adénylTransférase 4

1.2.2 - Préparation de [Nam-carboxyl-C^{14}]DPN 4

1.2.3 - Préparation de [ribose-C^{14}]DPN 5

1.2.4 - Préparation de NMN marqué à partir de DPN marqué 6

1.2.5 - Synthèse d' [α-P^{32}]ATP et des autres [α-P^{32}]nucléosides triphosphates 6

1.2.6 - Préparation de [P^{32}-P^{32}]ADPR à partir de [p^{32}-P^{32}]DPN et de DPNase de rate de boeuf 7

1.2.7 - Autres sources de nucléotides radioactifs 7

1.3 - Enzymes 7

1.3.1 - Préparation de DPNase de rate de boeuf 7

1.3.2 - Autres sources d'enzymes 8

2 - METHODES 9

2.1 - Dosages 9

page :

2.1.1 - Dosage des nucléotides à pyridine..... 9

2.1.1.1 - Dosage fluorométrique..... 9

2.1.1.2 - Dosage enzymatique du DPN,..... 9

2.1.1.3 - Méthode du KCN..... 10

2.1.2 - Dosage colorimétrique de l'ion phosphate 10

2.1.3 - Dosage colorimétrique du désoxyribose.. 10

2.1.4 - Dosage colorimétrique du ribose..... 10

2.1.5 - Mesure du pouvoir réducteur des oses... 10

2.1.6 - Oxydation périodique des ribofurano-sides..... 11

2.1.7 - Dosage d'azote..... 11

2.1.8 - Dosage des protéines..... 11

2.1.9 - Spectre d'absorption dans l'ultra-violet : dosage spectrophotométrique des nucléotides adényliques..... 12

2.1.10- Analyse des acides aminés. 12

2.2 - Chromatographie sur papier..... 12

2.2.1 - Solvants employés..... 12

2.2.1.1 - Chromatographie des nucléotides, nucléosides et bases..... 12

2.2.1.2 - Chromatographie des oses..... 13

2.2.1.3 - Chromatographie du ribose méthylé..... 13

2.2.2 - Révélateurs chromatographiques..... 13

2.2.2.1 - Les nucléotides, nucléosides et bases..... 13

2.2.2.2 - Les esters phosphoriques..... 13

2.2.2.3 - Les sucres réducteurs..... 14

2.2.2.4 - Les sucres méthylés..... 14

2.2.2.5 - Les corps marqués 14

2.3 - Electrophorèse sur papier 14

2.4 - Chromatographie sur colonne... 15

2.4.1 - Chromatographie des nucléotides sur colonne de Dowex 1 X 2 ou 1 X 8..... 15

2.4.2 - Préparation de la DEAE cellulose..... 15

2.4.3 - Colonne d'hydroxylapatite..... 15

2.4.4 - Colonne de CM cellulose..... 15

2.5 - Méthylation du ribosyladénosine issu du pseudoADPR..... 16

Processus opératoire :

2.5.1 - Méthylation..... 16

2.5.2 - Hydrolyse acide..... 17

2.5.3 - Purification..... 17

2.5.4 - Chromatographie des dérivés méthylés... 17

2.6 - Préparation des noyaux de foie de poulet..... 18

2.6.1 - Méthode de DUMAS [7]..... 18

2.6.2 - Méthode de CHAUVEAU, modifiée par ZALTA 18

2.7 - Préparation des nucléotides..... 19

2.8 - Essais enzymatiques..... 20

2.8.1 - Conditions d'incubation pour la synthèse du polyADPR..... 20

2.8.2 - Conditions de l'hydrolyse pyrophosphatasique..... 21

2.8.3 - Conditions de l'hydrolyse par la 5'-mononucléotidase..... 21

2.8.4 - Conditions de l'hydrolyse par la phosphatase alcaline d'intestin de [illegible]..... 22

2.8.5 - Conditions d'hydrolyse par les enzymes nucléolytiques..... 22

2.8.6 - Conditions d'hydrolyse par les enzymes protéolytiques..... 22

2.9 - Préparation des extraits enzymatiques..... 23

3 - [illegible]..... 24

2ème Partie : PURIFICATION ET STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR.

1 - MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION DE POLYADPR IN VITRO..... 25

1.1 - [illegible] et des animaux..... 25

1.2 - Nature des éléments de l'ATP, du NMN et du DPN incorporés dans le matériel acido-insoluble..... 26

2 - PURIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VITRO..... 29

2.1 - Traitement par les enzymes nucléolytiques.... 30

2.2 - Lavage par l'acide trichloracétique..... 30

2.3 - [illegible]..... 30

2.3.1 - Protéolyse..... 31

2.3.2 - [illegible]..... 31

2.4 - Précipitations par le chlorure de magnésium et l'éthanol 50 p.cent..... 31

3 - CARACTERISTIQUES DU POLYADPR..... 32

3.1 - Propriétés physico-chimiques..... 32

page :

3.2 - Etude analytique..... 33

3.2.1 - Analyse chimique du polyADPR..... 33

4 - STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR..... 36

4.1 - Hydrolyse du polyADPR par la pyrophosphatase du venin de serpent : obtention du pseudo-ADPR (pseudoADPR)..... 36

4.1.1 - Cinétique de l'hydrolyse ménagée 36

4.1.2 - Analyse de l'hydrolysat obtenu par hydrolyse pyrophosphatasique poussée du polyADPR..... 37

4.1.2.1 -Fractionnement de l'hydrolysat pyrophosphatasique..... 37

4.1.2.2 - Nature du pic I = 5'AMP 38

4.1.2.3 - Pic II : pseudoADPR..... 38

4.1.2.3.1 - Analyse chimique du pic II 38

4.1.2.3.2 - Produits de l'hydrolyse acide ménagée du pseudoADPR 40

4.1.2.3.2.1 - Fraction I = adénine. 40

4.1.2.3.2.2 - Fraction II = 5'AMP. 40

4.1.2.3.2.3 - Fraction III = R_5P.. 40

4.1.2.3.3 - Hydrolyse phosphatasique du pseudoADPR = obtention de ribosyladénosine..... 41

4.1.2.3.4 - Résultats de la méthylation du ribosyladénosine 42

4.1.2.3.5 - Formules de ribosyladénosine et du pseudoADPR..... 44

4.2 - Structure primaire du poly DR ribose.. 44

4.3 - Confirmation de la structure du polyADPR par les résultats de l'hydrolyse acide..... 45

4.3.1 - Fractionnement des composés obtenus après hydrolyse acide (HCl 0,01 N) du polyADPR..... 45

4.3.2 - Identification de la fraction II:ADPR. 46

4.4 - Mise en évidence d'oligomères de l'ADPR après hydrolyse limitée du polyADPR..... 47

4.4.1 - Hydrolyse acide partielle du polyADPR. 47

4.4.2 - Hydrolyse pyrophosphatasique partielle du polyADPR..... 49

4.5 - Longueur des chaînes de polyADPR..... 50

3ème Partie : POLY ADENOSINE DIPHOSPHORIBOSE : MISE EN ÉVIDENCE ET BIOSYNTHESE IN VIVO.

1 - CONDITIONS OPTIMALES POUR LA SYNTHESE DU DPN..... 54

2 - PURIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VIVO..... 54

3 - IDENTIFICATION DU POLYADPR SYNTHETISE IN VIVO..... 55

3.1 - Hydrolyse pyrophosphatasique..... 56

3.2 - Hydrolyse acide..... 57

4ème Partie : POLY ADP RIBOSE SYNTHETASE.

I. METHODE DE PURIFICATION.

1 - LOCALISATION INTRANUCLEAIRE DE LA POLYADPR SYNTHETASE..... 59

2 - ESSAIS DE SOLUBILISATION DE LA POLYADPR SYNTHETASE PAR ACTION DE LA DNase SUR L'ENZYME AGREGE..... 61

3 - ESSAI DE PURIFICATION DE LA POLYADPR SYNTHETASE SELON LA METHODE DECRITE PAR ATKINSON POUR PURIFIER LA [illegible] 61

3.1 - Lavage et extraction des noyaux 62

3.2 - Fractionnement à l'acétone 62

3.3 - Adsorption - élution sur hydroxylapatite 63

3.4 - Précipitation au sulfate d'ammonium 63

4 - ESSAIS DE MODIFICATIONS DE LA METHODE D'ATKINSON POUR PURIFIER P_{30} 64

4.1 - Essais de traitement de P_{30} par la méthode d'[illegible] 65

4.2 - Essais de colonnes d'hydroxylapatite à force ionique élevée 65

4.3 - Bilan de la purification de la polyADPR synthétase en utilisant la méthode d'ATKINSON modifiée par l'introduction d'une colonne d'hydroxylapatite à force ionique élevée 67

5 - METHODE RETENUE POUR PURIFIER PARTIELLEMENT LA POLYADPR SYNTHETASE 68

5.1 - Préparation de l'extrait nucléaire 68

5.2 - Colonne d'hydroxylapatite 69

5.3 - Purification sur CM cellulose 69

II. PROPRIETES DE LA POLYADPR SYNTHETASE PARTIELLEMENT PURIFIEE.

1 - EFFET DES POLYANIONS 70

2 - pH OPTIMUM 71

3 - STIMULATION PAR LES CATIONS DIVALENTS 72

4 - STIMULATION PAR LES GROUPEMENTS-SH 72

5 - CINETIQUE DE LA REACTION 73

6 - PROPORTIONNALITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ENZYME..... 74

7 - EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LA VITESSE DE LA REACTION 74

8 - EFFET INHIBITEUR DE LA NICOTINAMIDE 75

9 - REVERSIBILITE DE LA REACTION 75

10- NATURE DU PRODUIT ACIDO-INSOLUBLE SYNTHETISE 78

DISCUSSION

1 - SYNTHESE, PURIFICATION ET STRUCTURE PRIMAIRE DU POLYADPR..... 81

2 - PROPRIETES DE LA POLYADPR SYNTHETASE..... 84

3 - PRESENCE DU POLYADPR IN VIVO ET ROLE BIOLOGIQUE.... 93

CONCLUSION ET RESUME 95

BIBLIOGRAPHIE 104

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse :

Le code génétique

Strasbourg, le 2 septembre 1968
Le Président du Jury,

J.P. EBEL

VU et permis d'imprimer
Strasbourg, le 7 septembre 1968

Le Doyen

J.H. VIVIEN